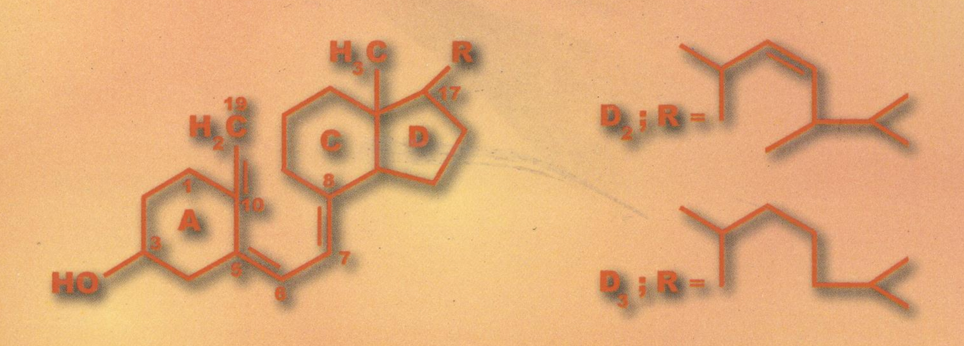
تحليل الفيتامينات

دكتور

عادل سيد عفيفى

فيتامين د - Vitamin D



المكتبة الأكاديمية



تحليل الفيتامينات

دكتور
عادل سيد عفيفي
أستاذ الكيمياء الحيوية - كلية الزراعة
جامعة القاهرة



الناشر
المكتبة الأكاديمية
٢٠٠٠

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حقوق النشر

الطبعة الأولى : حقوق الطبع والنشر © ٢٠٠٠ جميع الحقوق محفوظة للناشر :

المكتبة الأكاديمية

١٢١ شارع التحرير – الدقى – القاهرة

تليفون : ٣٤٨٥٢٨٢ / ٣٤٩١٨٩٠

فاكس : ٣٤٩١٨٩٠ – ٢٠٢

لا يجوز استنساخ أى جزء من هذا الكتاب بأى طريقة كانت
إلا بعد الحصول على تصريح كتابى من الناشر .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



الصفحة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الصفحة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

https://scholar.google.com/citations?user=t1aAacgAAAAJ&hl=en

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.facebook.com/groups/
/Biothesis

https://www.researchgate.net/profile/
/Salam_Ewaid

07807137614





مقدمة

إن علم المنظمات الحيوية أحدى علوم الكيمياء الحيوية الأساسية الذى يهتم بدراسة تنظيم العمليات الحيوية داخل جسم الكائن الحى بصفة عامه وداخل الخلايا بصفة خاصة . وقد تقدمت العلوم الحديثة وأهتمت بكل فرع من فروع المنظمات الحيوية كل على حده ، وأنشأت هيئات ومجلات علمية متخصصة تهتم بهذه الدراسات المتخصصة بغرض فهم وتوضيح ما يحدث داخل الوحدة الأساسية للحياة ألا وهى الخلية .

وعلم الفيتامينات Vitamins أحد أفرع هذه العلوم والذى يختص بدراسة الأوجة المختلفة للفيتامينات سواء من الناحية الكيميائية والتى تشمل تفاعلاتها الكيميائية وثباتها والعوامل المؤثرة عليها ... إلخ ، أو من الناحية الحيوية والتى تشمل الدور الذى تلعبه داخل خلايا الكائنات المختلفة (وظائفها الحيوية) وكيفية تخليقها وهدمها وتخزينها .... إلخ . وتحليل الفيتامنيات كمياً ونوعياً يحتل المكانة الرئيسية فى دراسة هذه الأوجه ، وقد اهتم به علماء الكيمياء الحيوية اهتماماً كبيراً ، وبفضل التقدم التكنولوجى الكبير فى أجهزة التحليل الدقيقة فقد تطورت أيضاً طرق تحليل الفيتامينات . وفى هذا العمل المتوضع سوف نستعرض بمشيئة الله سبحانه وتعالى بعض النقاط الهامة فى مجال تحليل الفيتامنيات والتى تضم الغرض من تحليل الفيتامينات ، وكيفية دراستها ، وما هى متطلبات الإنسان منها، ومصادرها الهامة، وأعراض نقصها، مع إضافة موجزة عن العناية بحيوانات التجارب والتى تستخدم كمرجع لتقدير كل فيتامين . ونسأل الله تبارك وتعالى أن ينفع بها ونسأله عز وجل التوفيق .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتـامينـــات

تبدأ قصة اكتشاف الفيتامينات منذ العصور القديمة ولكن لم يفتح الستار عن حقيقة هذه المركبات إلا منذ قرن تقريباً ، فقد عرف اليونانيين القدماء والرومان والعرب منذ القدم مرض العشى الليلى night blindness وكانوا يداونه بتناول الكبد . كما كان للفيتامينات قصة أيضاً مع البحارة ، ففى القرن السادس عشر كان يظهر على البحارة امراض نقص الفيتامينات وذلك لندرة ما يتناولونه من خضروات طازجة ، فكانوا يمكثون فى البحار شهور طويلة بدون خضروات طازجة فظهرت عليهم أعراض مرض الأسقربوط Sucrvy ووصف لهم الليمون لعلاج هذه الحالة . كما عانى البحارة اليابانيون من مرض البرى برى beriberi (فى القرن التاسع عشر) لما كانوا يتناولونه من أرز وتم معالجة أعراضه باستبدال الأرز بالشعير أو بزيادة نسبة ما يتناولونه من لحوم وخضروات . وفى نفس الفترة تقريباً لوحظت بعض أعراض نقص الفيتامينات على الحيوانات ومشابهة لأعراض نقصها على الإنسان ، وبذلك إتجه نظر العلماء إلى إن الجسم يحتاج إلى مغذيات أخرى غير الكربوهيدات والبروتينات والدهون والأملاح والماء حتى يصح ولا تظهر عليه الأعراض المرضية .

ومن الطريف فى هذه القصة إن أحد الفيتامينات (النياسين) كان يوجد فى المعامل الكيميائية (وسبق تحضيره نقياً) ولم يكن يعرف إنه يلزم لصحة الجسم إلى أن تم فصله وتعريفه . وجدول (١) يلخص تاريخ الفيتامينات ، تاريخ اكتشافها وفصلها وتاريخ توضيح تركيبها وتاريخ تخليقها ، هذا بالإضافة إلى المصدر الغذائى الذى فصل منه أول مرة .

والآن يعتبر علم الفيتامينات أحد أفرع العلوم البيولوجية الهامة ، وأصبح علماً قائماً بذاته نتيجة لما اكتشفه ومازال يكتشفه العلم الحديث من أدوار ووظائف حيوية وفسيولوچية للفيتامينات فى الإنسان خاصة وفى جميع الكائنات الحية عامة . وبمعاونة الأجهزة الحديثة والمتطورة يوم بعد يوم ، تكتشف أهميات فسيولوچية أو حيوية أو طبية جديدة لبعض الفيتامينات ، ونظراً لأهمية هذا العلم واهتمام العلماء به فقد أصبح اليوم مجلات علمية خاصة تهتم فقط بنشر الأبحاث الخاصة بالفيتامينات . هذا ، ومن الصعب تعريف الفيتامينات تعريفاً محدداً ، لأنها تختلف فى التركيب والخواص والوظائف ..... إلخ ، ولكن يمكن تعريفها بصفة عامة بأنها مجموعة مركبات عضوية لازمة لنمو الإنسان والحيوان وبعض الكائنات الحية الدقيقة بصورة طبيعية ويلزم تناولها من الخارج (أى لا تخلق داخله) ويحتاج إليها بكميات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

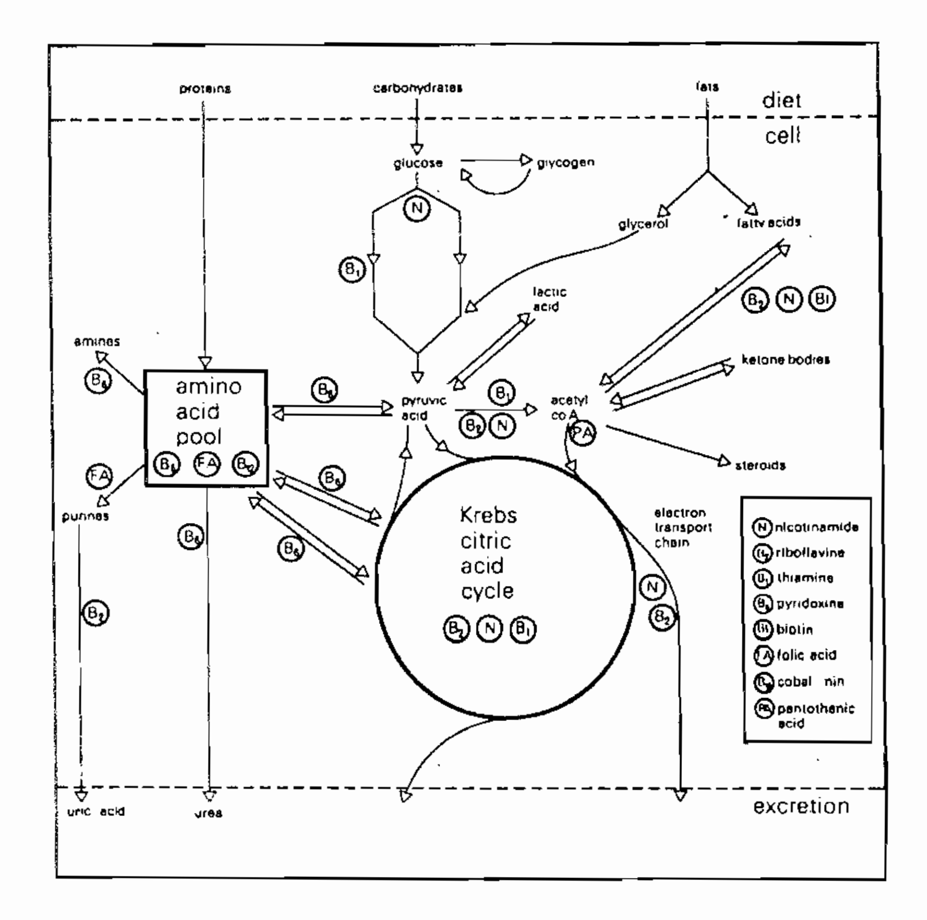
Vitamin	First isolated	Discovery	Isolation	Structure elucidated	Synthesis
Vitamin A	Fish liver oil	1909	1931	1931	1947
Provitamin A	Carrot, palm oil		1831	1930	1950
Vitamin D	Fish liver oil, yeast	1918	1932	1936	1959
Vitamin E	Wheat germ oil	1922	1936	1938	1938
Vitamin K	Alfalfa	1929	1939	1939	1939
Vitamin B_1	Rice bran	1897	1926	1936	1936
Vitamin B_2	Egg albumin	1920	1933	1935	1935
Niacin	Liver	1936 (1894)	1935 (1911)	1937	1894
Vitamin B_6	Rice bran	1934	1938	1938	1939
Vitamin B_{12}	Liver, fermentation	1926	1948	1956	1972
Folic acid	Liver	1941	1941	1946	1946
Pantothenic acid	Liver	1931	1938	1940	1940
Biotin	Liver	1931	1935	1942	1943
Vitamin C	Adrenal cortex Lemon	1912	1928	1933	1933

جدول (١) تاريخ الفيتامينات

بسيطة ، ولا تدخل فى بناء أنسجة الكائن الحى (ليست مركباً بنائياً) ، ولا تهدم لغرض إعطاء الطاقة (ليست مركباً مولداً للطاقة)، ولكنها لازمة لكل هذه العمليات التمثيلية (هدم وبناء) وللنمو وللتكاثر وللعمليات الفسيولوجية الأخرى .

وعادة ما تخلق الفيتامينات أو المركبات التى تتحول داخل الكائن الحى إلى فيتامينات precursors أو provitamins (بادئات) ، والتى تسمى أحياناً بأصل الفيتامين ، تخلق فى النبات وأحياناً يخلق بعضها فى بعض الكائنات الحية الدقيقة . وتختلف الخواص الكيميائية والطبيعية للفيتامينات . وكثيراً ما تقسم الفيتاميات إلى مجموعتين على حسب خاصية ذوبانها فى الماء أو فى مذيبات الدهون وهما فيتامينات ذائبة فى الدهون fat soluble vitamins وفيتامينات ذائبة فى الماء water soluble vitamins . ومعظم أفراد مجموعة الفيتامينات الذائبة فى الماء تشارك فى كثير من التفاعلات الكيميائية الحيوية داخل الخلايا الحية من خلال وظيفتها كمعاونات أنزيمية coenzymes لأنزيمات كثيرة تشارك فى حفز تفاعلات التمثيل الغذائى metabolism للكربوهيدرات والدهون والبروتينات التى تزود الجسم بالطاقة ، وشكل (١) يوضح أهمية الفيتامينات فى التمثيل الغذائى داخل الخلية .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (١) أهمية الفيتامينات فى التمثيل الغذائى الخلوى cellular metabolism

وتختلف متطلبات الكائن الحى من الفيتامينات تبعاً لأختلاف نوعه وجنسه وعمره وحالته .... إلخ ، فمثلاً تحتاج الدواجن إلى حوالى ٦٠ ملجم فيتامين جـ لكل كيلو جرام من الغذاء ، أما الخنزير فيحتاج إلى حوالى ١٥٠ - ٣٠٠ ملجم حسب نوعه وحالته ، بينما لا تحتاجه القوارض (ماعدا خنزير غينيا) ، وجدول (٢) يلخص أحتياجات بعض أجناس الحيوانات المختلفة للفيتامينات واللازمة لأفضل نمو optimum growth وأنتاج yield وخصوبة fertility تحت الظروف الطبيعية . وفى غياب هذه الفيتامينات فى غذاء الإنسان أو الحيوان أو نقصها تظهر أعراض مرضية معينة ، ولكل فيتامين أعراض النقص الخاصة به ، كما تختلف أعراض نقص الفيتامين من حيوان لآخر ، ومن ذلك تتضح أهمية الفيتامينات وأهمية تقديرها وتحليلها .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Table 36 Vitamin requirements of various animal species. Expressed as quantities per kg of ration unless otherwise stated.

Vitamin Quantities per kg of ration (about 90% dry matter)	*A*	*D_3*	*E*	*K*	*B_1*	*B_2*	*Nicotinic acid*	*Pantothenic acid*	*B_6*	*B_{12}*	*Folic acid*	*Biotin*	*Choline*	*C*
	I.U.	*I.U.*	*I.U.*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*	*mg*
POULTRY														
Chicks and broilers (starting)	15,000	1,500	30	3	3	8	50	20	7	0·030	1·5	0·15	1,500	60
Chicks and broilers (growing)	10,000	1,000	25	2	3	6	40	12	5	0·020	0·7	0·10	1,300	60
Hens, Ducks (laying and breeding)	12,000	1,200	30	2	3	6	40	15	5	0·010	1·5	0·20	1,100	50
Turkey (starting)	15,000	1,500	35	3	3	8	80	20	7	0·020	1·5	0·35	2,000	60
Turkey (growing and fattening)	10,000	1,100	30	2	3	6	70	15	5	0·015	1·5	0·20	1,700	60
Turkey (breeding)	12,000	1,200	40	2	3	8	70	25	6	0·015	1·5	0·30	1,700	50
PIGS														
Piglets (starting)	15,000	1,500	30	3	3	6	25	20	6	0·04		0·20	1,200	100
Pigs (growing)	10,000	1,000	25	1	2·5	5	20	15	5	0·03		0·15	1,000	
Pigs (fattening)	5,000	500	20	0·5	2	4	15	13	4	0·02		0·10	900	150
Sows (breeding)	12,000	1,200	25	1	2·5	6	15	12	5	0·02		0·22	900	
RUMINANTS														
Calves (0–3 months)*	20,000	2,000	40		4	7	25	12	5	0·02		0·10	400	500†
Cattle (rearing)**	25,000	3,000	150											
Cattle (fattening)**	40,000	5,000	250											
Dairy cows**	50,000	8,000	350											
Sheep and goats**	4,000	250	25											
HORSES														
Foals	10,000	1,500	50		6	10	30	12	3	0·03	3		150	
Yearlings	20,000	3,000	100		12	20	60	25	6	0·06	6		300	
Working and saddle horses	40,000	6,000	300		20	40	100	40	10	0·10	10		450	
Race horses and breeding horses	40,000	6,000	1,000		30	50	120	50	15	0·15	15		600	
OTHERS														
Dogs	10,000	1,000	40		3	5	25	10	3	0·03	0·3	0·25	1,000	
Cats	18,000	1,800	50		8	8	60	12	6	0·02	0·4	0·25	1,500	
Rabbits	9,000	900	40		2	6	50	20	2	0·01			1,300	
Mink and foxes	10,000	1,000	80		4	6	30	15	2	0·03	0·6	0·25	1,000	
Fish (trout)	8,000	1,000	125	15	10	25	200	50	15	0·02	4·0	1·00	1,500	450

* per day per 100 kg live weight. ** per day per animal. † 500 daily for the first two weeks.

جدول (٢) أحتياجات بعض اجناس الحيوانات المختلفة للفيتامينات ، والكميات عبر عنها بوحدات دولية (I.U.) أو ملجم لكل كيلو جرام من الغذاء فيما عدا بعض الحالات ومشار إليها .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الغرض من التحليل الكمى والنوعى للفيتامينات :-

هناك أغراض عديدة للتحليل الكمى أو النوعى للفيتامينات سواء على المستوى البحثى أو الغذائى أو الأكلينيكى .... إلخ ، وهذه الأغراض تضم مايلى :-

١ - تقدير محتوى الأغذية من الفيتامينات :-

من المهم بالطبع تقدير محتوى الأغذية الطبيعية من الفيتامينات المختلفة لغرض إظهار قيمتها الحيوية ، كما يقدر محتوى الأغذية المصنعة والمعلبة والمحفوظة .... إلخ من الفيتامينات لغرض دراسة تأثير المعاملات المختلفة عليها . ومن ناحية أخرى ، لابد من الأخذ فى الاعتبار وجود المواد المصاحبة للفيتامينات فى الأغذية المختلفة ، فقد تعطى الطرق الكيميائية نتائج عالية لما تحتويه من فيتامين ما ، ولكن طرق أخرى (مثل الطرق الحيوية) تعطى نتائج مخالفة لذلك، ويرجع ذلك إلى عدم تيسر الفيتامين حيوياً ، لذلك فلابد من تقييم مدى تيسره الحيوى bioavilability .

٢ - تقدير المحتوى الفيتامينى للمستحضرات الصيدلية والطبية : -

إن تقدير الفيتامينات فى المستحضرات الصيدلية pharmaceutical preparations أمر هام لتحديد الكمية الفعلية والحيوية من الفيامينات فى هذه المستحضرات ، ففى كثير من الأحيان توجد الفيتامينات فى هذه المستحضرات فى صورة غير نقية ولكن تستخلص من مصادره الطبيعية الغنية بها ، لذلك لابد من استخلاصها أولاً ثم تقديرها حتى نعرف محتواها بالضبط من الفيتامينات ، كما هو الحال فى مجموعة فيتامين ب المركب Vit . B complex حيث توجد فى الخميرة بكميات كبيرة جداً وتستخلص منها وتجهز فى صورة مستحضرات صيدلية .

٣ - تقدير المحتوى الكلى من الفيتامينات فى الأغذية الخاصة المدعمة بالفيتامينات :

مع زيادة متطلبات الحياة العصرية وإنشغال الإنسان فى العمل ، بات يصعب عليه تناول الأغذية الطازجة ويتناول الأطعمة المحفوظة والمعلبة والمجففة .... الخ ، وحيث أن هذه الأغذية تفقد معظم محتواها من الفيتامينات أثناء التصنيع ، فأصبح حتمياً تعويض الإنسان عن ذلك النقص ، فتصنع أغذية مدعمة بالفيتامينات . وفى أحيان كثيرة ، قد تصاب الأطفال بنقص فيتامينات لذلك تجهز لهم أغذية خاصة مدعمة بالفيتامينات أيضاً ، لذلك أصبح من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الضرورى تقدير محتوى هذه الأغذية من الفيتامينات .

أما بالنسبة للحيوانات (مثل حيوانات المزرعة - بقر - جاموس - غنم .. إلخ) عادة ما تجهز لها علائق مناسبة ويضاف إليها مخلوط فيتامينات ، وعلى ذلك من الضرورى أيضاً تقدير محتوى هذه العلائق من الفيتامينات وتقييمها حيوياً .

٤ - تقدير مستوى الفيتامينات فى السوائل الحيوية والأنسجة :

إن تحليل الفيتامينات وتقدير مستواها فى السوائل الحيوية biological fluids (مثل الدم والسيرم والبلازما و اللبن والبول .. إلخ) أمر ضرورى جداً فى الدراسات الأكلينكية ويعتمد عليها فى تحديد حالة المرضى بنقص الفيتامينات ، كما أن نتائج التحليل تستخدم فى تقييم الحالة الفيتامينية Vit . status فى الإنسان أو الحيوان .

٥ - تحديد متطلبات الكائن الحى من الفيتامينات : -

تمت دراسات كثيرة لتحديد متطلبات الإنسان فى مراحل حياته المختلفة من الفيتامينات، كما تمت مثل هذه الدراسات ومازالت تجرى على الحيوانات وبعض الكائنات الحية الدقيقة . هذا ، وتضم هذه الدراسات تحديد الصورة المثلى الواجب تقديمها له .

٦ - دراسة تأثيرات نقص وزيادة الفيتامينات على الكائن الحى :-

سبق وقد عرف الإنسان أعراض نقص الفيتامينات ، وكان لهذه الأعراض الفضل الأول فى اكتشافها ، وعلى ذلك كان ومازال من المهم دراسة تأثير نقصها فى الإنسان والحيوان على حد سواء لتلافى حدوثها والوقاية منها ، وتعرف هذه الحالات بالـ hypovitaminosis . ومن ناحية أخرى ، عند زيادة تناول الفيتامينات تحدث أعراض مشابهة لنقصها وتعرف بأسم hypervitaminosis . وعادة ما تظهر هذه الحالات فى مجموعة الفيتامينات الذائبة فى الدهون لأنها تخزن فى الجسم وتصبح حملاً على الجسم يجب التخلص منه ، ومن هنا تنشأ أعراض التسمم بالفيتامينات . لذا كان من المهم دراسة تأثيرات نقص وزيادة الفيتامينات فى جسم الإنسان والحيوان على حد سواء .

٧ - دراسة تأثيرات الفيتامينات الطبية والعلاجية : -

مع تقدم العلوم الحيوية والتقنيات الحديثة وتوافر الأجهزة الدقيقة للتحليل ، أمكن كشف النقاب عن تأثيرات جديدة لم تكن تعرف من قبل للفيتامينات ، مثل تأثير فيتامين أ على

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

السرطان (Meyskens et al ., 1984) وأمكن وقف نموه بالفيتامينات ، لذا فهناك دراسات حديثة تجرى على إظهار الدور الطبى والعلاجى للفيتامينات .

٨ - دراسة مشابهات الفيتامينات ومشجعاتها ومضادتها : -

إن الأجهزة الدقيقة الحديثة تمكنها الآن تحليل مشابهات الفيتامينات isomers كمياً ونوعياً ، وهذا له دوره فى ابراز الدور الحيوى لهذه المشابهات . وتجرى دراسات عديدة على وظيفة مشابهات الفيتامينات ونشاطها الحيوى بالنسبة للفيتامين الأصلى ، وغيرها من الدراسات . كما تجرى الدراسات أيضاً على المركبات التى تشجع وتزيد من كفاءة الفيتامين فى جسم الإنسان والحيوان والتى تعرف بأسم synergists . والعكس بالعكس ، فهناك أيضاً مركبات تضاد فعل الفيتامين والتى تعرف بأسم (antagonists (antivitamins ، لذا فتجرى الدراسات عليها أيضاً .

٩ - دراسة التمثيل الغذائى (الأيض) والوظائف الحيوية للفيتامينات :

من المهم أيضا دراسة تكسير أو هدم الفيتامين catabolism وتخلقيه داخل الكائن الحى anabolism ، وهذا يتطلب اجراء التحليل الكمى والنوعى للفيتامينات ومركبات تكسيرها أو تخليقها الوسطية ، بالاضافة إلى ذلك دراسة وظائفها الحيوية داخل خلايا الكائن الحى .

١٠ - دراسات أخرى :-

هناك دراسات أخرى كثيرة تجرى على الفيتامينات يلزم لها التحليل الكمى والنوعى نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر مايلى :-

دراسة الخواص الطبيعية والكيميائية ، دراسة مسارها فى الجسم (امتصاص ، نقل ، تخزين ، أفراز .... إلخ) ، تفاعلاتها مع الجواهر الكشافة المختلفة .... إلخ .

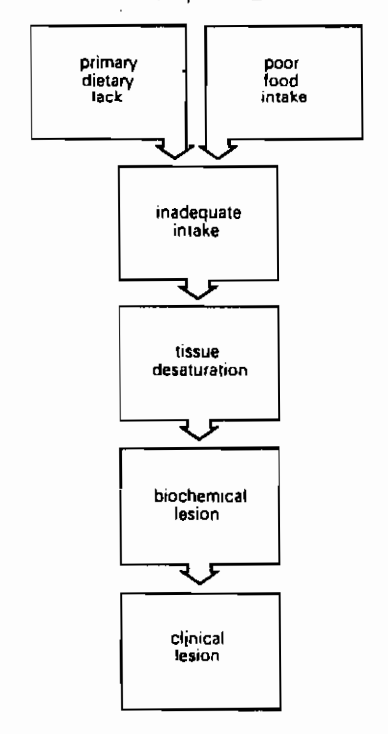
فحص وتحليل الحالة الغذائية للفيتامينات فى الإنسان : -

إن تشخيص حالات نقص الفيتامينات لم يصبح الآن مشكلة للعاملين فى المجال الأكلينيكى عندما تكون هذه الحالات فى صورتها الكلاسيكية (التقليدية) أو فى صورتها الظاهرة للعيان ، فكثير من علامات نقص الفيتامين المرضية غالباً ما تكون متخصصة لكل فيتامين . أما فى حالة ما يكون هناك نقص بسيط فى الفيتامينات ولم تظهر أعراضه للعيان فيكون من الصعب تشخيصها إلا بعد اجراء التحليلات اللازمة . ويتم تحديد حالة نقص

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين أو تحديد مرحلتها بقياس مستوى الفيتامين فى سوائل الجسم .

وأعراض نقص الفيتامين تمر بعدة مراحل ، كما يلخصها شكل (٢) . فتبدأ الخطوات بالمرحلة الأولى وفيها يكون المأخوذ من الفيتامينintake غير كافى لحاجة الجسم (أقل من متطلبات الجسم للفيتامين) . وتلك إما أن تنشأ من النقص الغذائى نفسه بما يحتويه الغذاء من فيتامين ، أو تنشأ من نقص الفيتامين فى الغذاء أو من ضعف poor امتصاصه ، أو من عجز نقله داخل الجسم ، أو من زيادة احتياجات الجسم إليه (كما فى حالة الحمل مثلاً) . وفى حالة ما يكون المأخوذ من الفيتامين غير كافى وقليل ، تحدث حالة من عدم تشبع الأنسجة منه . والمعدل الذى عنده تحدث هذه الحالة يختلف من فيتامين لآخر ، ويعتمد على كمية المخزن منه فى الجسم أو فى النسيج ، وبمجرد عدم تشبع الأنسجة و بلوغ المستوى الحرج critical level تُفقد الوظائف التمثيلية metabolic functions للفيتامين وتحدث تغيرات فى الأنشطة الأنزيمة المرتبطة بهذا الأنزيم . وعندما تبلغ تلك التغيرات بدورها المستوى الحرج أيضاً ، تظهر الأعراض الأكلينيكية لنقص الفيتامين . وشكل (٢) يلخص مراحل ظهور أعراض نقص الفتيامين فى جسم الإنسان أو الحيوان .



شكل (٢) مراحل أعراض نقص الفيتامين

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تحديد سبب نقص الفيتامينات : -

يمكن تحديد سبب نقص الفيتامين بأى من التكنيكات التالية : -

١ - تقدير محتوى الغذاء من الفيتامين : -

وفيها يتم تحليل المحتوى الفيتاميني فى الغذاء كمياً ونوعياً والمفقود منه بالمعاملات المختلفة و المفقود منه بالتخزين .... إلخ . وهذا أمره سهل ولكن المشكلة تكمن فى محتوى الفيتامين القابل للامتصاص الحقيقى true absorbable Vit. ومدى تيسره حيوياً . فلابد من معرفة الصورة الموجود عليها الفيتامين والقابلة للأمتصاص خلال الجهاز الهضمى .

٢ - تقدير عدم تشبع الأنسجة من الفيتامين : -

هناك ثلاث أنواع من الأختبارات تستخدم لتقدير عدم تشبع الأنسجة من الفيتامين ، أثنين من هذه التكنيكات عادة ما يكونا سهلين عند اجرائهما ولكنهما لا يغطيا المشكلة بالكامل، أما التكنيك الثالث فعادة ما يكون صعب ومعقد وهو فقط مناسب للتجارب البحثية . وفيما يلى موجز عن هذه التكنيكات : -

أ - قياس مستوى الفيتامين فى الدم فى وجود أو عدم وجود جرعة أختبارية test dose : -

هناك طرق كثيرة تستخدم لتقدير الفيتامينات فى الدم أو البلازما أو السيرم ، ولكن الفيتامين فى البلازما لا يكون له وظيفة تمثيلية ولكنه يكون فقط كعابر transit من نسيج لنسيج أخر . وقلته فى البلازما ربما تكون دليلاً على حالة مستوى الفيتامين بين الخلايا وبعضها ، وربما لا يكون هذا صحيحاً .

فعند تغذية شخص بالغ سليم ومعافى صحياً على غذاء خالى من حمض الأسكوربيك ، فبعد حوالى ٦ أسابيع من بداية هذه الظروف ينخفض مستوى حمض الأسكوربيك فى السيرم وربما يبلغ الصفر ، ويحتاج هذا الشخص إلى عدة أسابيع أزيد من ذلك قبل أن تظهر عليه أول أعراض مرض الأسقربوط . وبالرغم أن هذا يكون حقيقة إلا إن كل المرضى بالأسقربوط يكون مستوى حمض الأسكوربيك فى السيرم لديهم منخفضاً جداً ، والعكس لا يكون صحيحاً . وقد توجد مستويات منخفضة من حمض الأسكوربيك فى البلازما مع غياب إى دليل أكلينكى على نقص حمض الأسكوربيك ولحل هذه المشكلة لابد من أجراء اختبار

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الـ loading dose للفيتامين ويقدر مستوى الفيتامين فى البلازما بعد اعطاء جرعة فيتامين محددة ، وهذا الأختبار عادة ما يعكس كمية الفيتامين الفعلية التى أُخذت بواسطة الأنسجة . ومن الصعب اجراء التكنيك كمياً بالكامل ، فلو اعطيت جرعة عالية من الفيتامين فإن مستواه فى البلازما قد يزيد إلى الحد الذى يجعل الكلية تخرجه (ثلاث أصعاف)، فيفقد فى البول .

ب - قياس معدل الافراز الكلوى فى وجود أو عدم وجود جرعة أختباريه : -

بالرغم من أن كمية الفيتامين المفرزة فى البول لكل يوم عادة ما تكون مرتبطة بكمية المأخوذ منه يومياً ، إلا أنها لا تمثل الأنعكاس الحقيقى لحاله النسيج . وهذا أمر حقيقى لحد معين أو لقدر معين من حمض الاسكوربيك ولكنه يكون أكثر وضوحاً لفيتامين أ ، حيث تأخذ منه الأنسجة كمية كبيرة ويخرن فى البعض الآخر ، وعلى ذلك تظهر نفس المشكلة عند تقدير الفيتامين فى البلازما فى وجود أو عدم وجود جرعة أختبارية . أكثر من ذلك ، فهناك مشاكل عديدة هامة لعينات البول المأخوذة خلال ٢٤ ساعة لتقدير حالة الفيتامين ، فالتقدير عادة ما يتم على عينات صغيرة والمستويات تكون اذاً مرتبطة بأفراز الكرياتينين Creatinine excretion . ويستخدم الكرياتينين كدليل index لأنه عندما يكون مستواه فى البلازما طبيعياً، فمعنى ذلك إن كفاءة الكلية على أحسن حال ، وتكون كفاءة الترشيح المباشر خلال الـ glomeruli جيدة . والتقدير العشوائى random فى عينات البول والمرتبط بالكرياتينين (كفاءه وظيفة الكلى) ، بالرغم من أنه الأسهل والأيسر لأنه يُنجز لأغراض كثيرة إلا أنه يعطى المعلومات الأقل فاعلية والأقل أهمية .

حـ - قياس المستويات فى الأنسجة : -

هذا هو التكنيك الوحيد فى التكنيكات الثلاث الذى يعطى التمثيل الحقيقى لعدم التشبع بالفتيامين ، وهو بطبيعة الحال صعب اجراءه ويرجع ذلك إلى صعوبة أخذ عينات من النسيج tissue sampling وإلى صعوبة التكنيكات التحليلية .

فى حالة حمض الأسكوربيك ، أستخدمت طريقتين لتقدير مستوياته فى الأنسجة . ففى الطريقة الأولى يتم تقديره فى كرات الدم الحمراء RBCs والبيضاء leucocytes ، وفى الصفائح الدموية Platelets . وتلك الطريقة أظهرت ارتباطاً وثيقاً بالعلامات الأولى للأسقربوط، ويوصى بهذه الطريقة لتقدير حالة تشبع أو عدم تشبع الأنسجة من حمض الأسكوربيك .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فالتقدير الحقيقى والفعلى هذا بالطبع عادة ما يكون شاقاً ومضنياً . محاولة أخرى اجريت لتقدير درجة تشبع النسيج من حمض الأسكوربيك وكانت عن طريق اختبار بين طبقات البشرة intradermal test باستعمال صبغة dichlorophenolindo phenol . وتعتمد هذه الطريقة على وجود المواد المختزالة فى الجلد ، وهى على ذلك غير متخصصه non-specific . وكلا التكنيكين يطلبا لتقدير مستوى التشبع بالفيتامين فى الجسم ، ولا يراعى فيهما المتطلبات التمثيلية .

٣ - قياس الانخفاض فى النشاط الأنزيمى الخاص لكل فيتامين : -

يمكن تقدير مستوى الفيتامين فى الجسم عن طريق اجراء اختبارات للفاعلية البيوكيميائية التمثيلية biochemical metabolic efficiency والتى ترتبط ارتباطاً مباشراً بمتطلبات النسيج من الفيتامين حتى يحافظ على حيويته ونشاطه ، وهى تعطى دلالات يعتمد عليها ويوثق بها أكثر لحالة الفيتامين بالنسبة لما يحتاج اليه النسيج من فيتامين ، ولسوء الحظ فهذه الاختبارات متاحة فقط لعدد محدود من الفيتامينات .

لو أمكن تطبيق هذا النوع من الاختبارات ، فإنه من المهم استخدام تكنيكاً متخصصاً للفيتامين ، ولا يكون هناك مسارات أخرى للتمثيل الغذائى أو لا يكون هناك أيضاً معاون أنزيمى آخر يحل محله . ففى معظم مسارات التمثيل الغذائى غالباً ما يكون هناك خطوة واحدة أو خطوتين محددتين لمعدل المسار rate-limiting steps ، فإن لم يكن الفيتامين جزءاً من أحدى هاتين الخطوتين ، فإنه قد يكون بطريقة غير مباشرة يشارك فى مسار آخر ، وعلى ذلك فنقص الفيتامين قد ينعكس بصورة أو بأخرى على مسار التمثيل الغذائى .

وهناك أمثلة عديدة لهذا النوع من الاختبارات ، منها على سبيل المثال لا الحصر ، ارتباط تمثيل البيروفات مع مستوى الثيامين بيروفوسفات T. P. P. ، وتقدير الـ Creatinuria فى حالة نقص التوكوفيرول ، ودراسة التمثيل الغذائى للتربتوفان وعلاقته بنقص البيريدوكسين وتقدير البروثرومبين Prothrombin فى حالات نقص فيتامين ك K .

٤ - الفحص الاكلينيكى : -

كما هو معروف إن لكل فيتامين أعراض symptoms وعلامات signs نقص معينة خاصة به . وبمجرد ظهور هذه الأعراض فى صورتها التقليدية ، فإنه يمكن بسهولة وفى الحال

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تمييز حاله النقص . وهناك طرق أكلينيكية خاصة تطبق لتحديد هذا النقص مثل اختبار التكيف مع الظلام dark adaptation لنقص فيتامين أ. وعند اجراء إي فحص أكلينيكى لابد من معرفة التاريخ المرضى للشخص ، كما يجرى فحص طبى شامل قبل أن تشخص الحالة بالضبط . وهناك فحوص أكلينيكية معينة تجرى لأعضاء معينة فى الجسم ، ومن خلالها يمكن تشخيص حالة نقص الفيتامين ، وهذه الأعضاء تشمل الجلد skin والفم mouth والعين eye والجهاز العصبى .... إلخ .

أ - فحص الجلد : -

غالباً ما يرتبط نقص الفيتامينات بتغيرات معينة تحدث فى جلد وشعر حيوانات التجارب ، كما يحدث ذلك أيضاً فى الإنسان . فعلى سبيل المثال فى حالة نقص فيتامين أ يحدث تقرن للجلد (skin keratinization (toad skin ، وفى حالة نقص فيتامين ك يحدث تبقع جلدى cutáneaus purpura وهذه الحالة هى انعكاس مباشر لنقص البروثرومبين ، وفى حالة نقص حمض النيكوتينيك تحدث حالة البلاجرا pellagra على الجلد (يشبه فى أعراضه أعراض الحروق الشمسية) . وهناك أعراض أخرى كثيرة تحدث عند نقص فيتامينات أخرى مثل حمض الأسكوربيك والريبوفلافين والبيريدوكسين والبيوتين وحمض البانتوثينيك ، والتى يمكن تحديدها بفحص الجلد أكلينيكياً .

ب - فحص الفم : -

نقص مجموعة فيتامينات ب المركبة عادة ما تؤثر على الفم ، ولذلك عن طريقة فحص الفم يمكن التمييز بين بعضها البعض . وفى بعض الأحيان يكون هذا الأمر صعباً ويرجع ذلك إلى إن كثيراً من حالات النقص يكون سببها نقص أكثر من فيتامين ، فعلى سبيل المثال نقص حمض النيكوتينيك يؤدى إلى التهاب اللثة gingivitis والتهاب الفم stomatitis وغيرها من الأعراض على الفم . ونقص فيتامين جـ أيضاً يؤدى الى التهاب اللثة وفقد الأسنان وقد يحدث نزيف فى الفم . هذا ، وهناك أعراض متخصصة تظهر على الفم نتيجة لنقص الريبوفلافين والبيريدوكسين وفيتامين ب١٢ والبيوتين .

جـ - فحص العين : -

كما هو معروف إن نقص فيتامين أ يؤدى إلى أضرار معينة فى الشبكية retina ومرض

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

العشى الليلى ، ونقص الريبوفلافين يسبب vasculation of cornea (ظهور أوعيه دموية كثيرة فى قرنية العين) ، ونقص الثيامين وحمض النيكوتينيك وحمض الأسكوربيك وفيتامين ك يضاً تظهر أعراض معينة فى العين .

د - فحوص أخرى : -

هذا ، وهناك فحوص أكلينيكية أخرى تجرى على الجهاز الهضمى (مثل نقص الثيامين وحمض النيكوتينيك يسببا أسهال diarrhoea) ، وأخرى تجرى على الجهاز العصبى المركزى (نقص الفيتامينات يؤثر عليه)، وثالثة تجرى على العظام bones (مثل نقص فيتامين د يسبب الكساح rickets) ، ورابعة تجرى على القلب والأوعية الدموية (مثل نقص الثيامين يسبب فشل فى الدورة الدموية circulatory failure والذى يرجع إلى ارتباك فى عضلة القلب) ، وغيرها من الفحوص .

الاختبارات المعملية لنقص الفيتامينات : -

تجرى اختبارات معملية كثيرة لتحديد مستوى نقص الفيتامين فى الجسم ، وهذه الاختبارات تضم ما يلى : -

١ - تقدير مستوى الفيتامين فى الدم أو فى السيرم .

٢ - تقدير مستوى الفيتامين فى بعض خلايا الدم (كما هو الحال فى تقدير فيتامين جـ الذى يقدر فى خلايا الدم البيضاء) .

٣ - تقدير نشاط أحد الأنزيمات التى يشارك فيها الفيتامين .

٤ -تقدير كمية الفيتامين المفرزة فى البول ، أو نواتج تكسيره أو تقدير أحد المركبات التى يشارك الفيتامين فى تمثيلها .

٥ - الفحص بأشعة أكس X- ray examination (كما هو الحال فى فيتامين د) .

هذا ، وهناك أختبارات معملية أخرى خلاف تلك الأختبارات تجرى وقت الضرورة . ومما هو جدير بالذكر إنه يجرى أحياناً أكثر من أختبار معملى لتحديد حالة النقص بالضبط حتى يتسنى علاجها .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

رعاية حيوانات التجارب والعناية بها لتجارب التغذية

معظم الأبحاث الحيوية تستخدم حيوانات التجارب experimental animals لاجراء الدراسات المختلفة عليها وتعتبر فى هذه الحالة كنموذج model تجريبى لما يحدث داخل الكائن الحى الحيوانى . فعادة ما تتم التقديرات الحيوية bioassay سواء الكمى منها أو الوصفى على هذه الحيوانات بدلاً من الإنسان أو الحيوانات الكبيرة (مثل البقر أو الجاموس)، وعلى ذلك فهذه الحيوانات ساهمت فى خدمة الإنسان والحيوان على حد سواء . وهذه الحيوانات أصبحت وسوف تظل من أهم الوسائل الهامة التى يعتمد عليها فى اجراء البحوث الحيوية ، والنتائج المتحصل عليها من هذه التجارب هى اللبنة الأولى والمرجع الاساسى لطرق القياس والتقديرات الأخرى (الطرق الطبيعية أو الكيميائية وغيرها) . وعادة ما تستخدم قوارض rodents (مثل الفأر الأبيض الكبير albino rat والفأر الصغير mouse والأرنب rabbit والهامستر وخنزير غينيا ... وغيرها)، أو حيوانات أخرى مثل الكلاب والقطط والكتاكيت معروفة السلالة والنسب لضمان سلامة الدراسة . كما تساهم الأبحاث على هذه الحيوانات فى نواحى كثيرة مثل اظهار الدور الحيوية لمركبات كثيرة خلاف الفيتامينات مثل السموم والمبيدات والأدوية .... إلخ ، بالأضافة إلى اختبارها وتقييمها حيوياً ، واختبارات تقييم الأغذية والمضافات الغذائية المختلفة (اختبارات التغذية) ، واختبارات العدوى بالطفيليات و الميكروبات والفيروسات ، واختبارات الحمل ..... إلخ ، هذا بالأضافة إلى امكان استخدام هذه الحيوانات فى التجارب الجراحية وغيرها قبل تطبيقها على الإنسان .

على ذلك فإن العناية بحيوانات التجارب وتربيتها فى بعض الأحيان اذا أقتضت الضرورة امراً هاماً جداً فى هذا الشأن ، ولذلك وقبل أن نخوض فى الفيتامينات وتحليلها ، لابد أن نلقى بعض الضوء على حيوانات التجارب ورعايتها والعناية بها .

بيت الحيوان Animal house

المقصود ببيت الحيوان هو ذلك المكان الذى تعيش فيه حيوانات التجارب ، فعادة ما تربى هذه الحيوانات فى أقفاص خاصة مناسبة لحجم ومساحة و وزن الحيوان ، وتوضع هذه الأقفاص فى مبنى الحيوانات . ويفضل عادة تربية كل نوع من حيوانات التجارب فى حجرة خاصة به ، ويلحق بهذه الحجرات معمل لتشريح الحيوانات مجهز بثلاجة كهربائية لحفظ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الحيـوانات النافقـة لحين التخلص منها بالحرق . ويشـترط فى المبنى الخاص برعاية وتربية حيوانات التجارب أن يكون مبنى صحى جيد التهوية ونظيف ومكيف وبعيداً عن الضـوضـاء ، وكل حجرة من حجراته تحتوى على أجهزة صرف صحى ومصدر للمياه وغيرها من اللوازم الأخرى . ومن الجدير بالذكر ، إن بيت الحيوان الحديث أصبح متطوراً كثيراً وأصبح من النظافـة والتكيف والعناية .... . إلخ إلى مـا يشـابة المسـتـشـفـيـات ، لدرجـة إنه فى بعض الحـالات (مـثل مـعـامل أنتـاج المصل واللقـاح) لا يدخله إلا المتـخـصـصـين والعـاملين فـقط والحاصلين على شهادات خاصة .

أ - الظروف المناخية

يجب أن تعيش الحيوانات المعملية فى غرف جيده التهوية وليس بها تيارات هوائية مباشرة لتلافى البرد cold أو للمحافظة على غذائها من التلوث بالأتربة والملوثات الاخرى عن طريق تلك التيـارات أو لعدم تطايرها مع الهـواء . ويجب أن تكون الأمـاكن التى تربى فيـهـا الحيوانات مضيئة أيضاً أثناء النهار ومظلمة فى الليل ويجب تنظيم فترات الضوء والظلام فى غرف معيشة الحيوانات المعملية على حسب التجربة المجراه . فلا تعرض الفئران rats (أو الكتاكيت chicks) لضـوء الشمس المباشر حتى ولو نفذ من خلال زجاج النوافذ حيث يجب تلافيه خصوصاً عند تقدير فيتامين «د» . والفئران حيوانات ليلية وتحدث ضـجـة زائدة عن اللازم وهى نشطة أثناء اليوم ، لذا يجب عدم التدخل فى عاداتها الطبيعيـة . ويوص بغرف مكيفه الهواء للعناية بالحيوانات ، لكنها غير ضرورية فيما عدا عندما تكون درجات الحرارة شـديدة . ودرجـة الحـرارة المثلى optimum temerature للحيـوانات الصـغيرة small animals هى ٢٤ ± ٢ °م .

ومما هو جدير بالذكر ، أنه عند تعرض القوارض لدرجة حرارة عالية نسبياً (أكثر من ٨٠° فهرنهيتية - حوالى ٢٦،٦ ° م) فإن نشاطها التكاثرى يقل ، ويقل مقدار ما تتناوله من طعام food intake وتصبح الحيوانات فى حالة نعسان وخامله lethargic وقليلة النشـاط . وجدول (٣) يلخص مدى درجات الحرارة المناسبة والنسبة المئوية للرطوبة المناسبة لبعض حيوانات التجارب .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Species	°F	% Relative humidity
Rat	65 -73	45 - 55
Mouse	68 - 75	50 -60
Guinea pig	65 - 75	45 - 55
Rabbit	60 - 75	40 - 45
Hamster	68 - 75	40 - 45
Dog	65 - 75	45 - 55
Cat	70 - 75	40 - 45
Monkey	62 - 85	40 - 75

جدول (٣) درجات الحرارة والنسبة المئوية للرطوبة المناسبة لحيوانات التجارب المختلفة .

ومن الاحتياطات الهامه واللازمة أيضاً هو عمل ستائر للنوافذ ، كذلك النظافة المتكررة بالماء الجارى للجدران والأرضيات وحماية هذه الحجرات من الحشرات الطفيلية الضارة ومن القوارض البرية wild rodents .

ب - مقاومة الحشرات : -

عندما يلاحظ ظهور الحشرات insects مثل الصراصير roackes والذباب flies والبق bedbugs يجب أبادتها بعناية كافية . وتستعمل المبيدات الحشرية الحديثة modern insecticides سواء المسحوقية منها أو التى تستعمل بالرش . ويتم استعمال (وضع) هذه المبيدات بتركيزات عالية فى الشقوق والفتحات وأماكن احتمال تكاثر وأنتشار هذه الحشرات . وتغلق الغرفة لعدة ساعات أو طوال الليل over night ثم تهوى جيداً قبل اعادة الحيوانات إليها ، ويجب التاكد من التخلص من أثار هذه المبيدات .

وإذا لم يمكن تحريك الأقفاص أو خروج الحيوانات من الغرفة ، فتستعمل المبيدات الحشرية بواسطة فرشاة ناعمة على الجدران والأرضيات (خصوصاً فى الأركان والشقوق

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

والثنايا) . ويمكن استعمالها أيضاً على أرفف أقفاص الحيوانات cage racks وعلى التجهيزات أو المعدات الأخرى فيما عدا الأقفاص نفسها . وإذا لم يكن لهذه المعامله تاثيراً جيداً ، فلابد من أعادتها بعد ٦ أسابيع للقضاء على الجيل الثانى من الحشرات .

هـ - النفايات(الفضلات) Excreta (بول ، براز ، فضلات غذائية ..... إلخ) : -

يجب ازالتها كل يومين على الأقل ، ويمكن استعمال بكر ورق paper rolls أو طبقات سيمكة من ورق الجرائد تحت أرفف النفايات الموجودة فى الأقفاص وأسفل قاعدة القفص، وهذا يسهل هذه العملية . وتفضل أقفاص سلك مجلفن بالزنك والرصاص حتى لا تصدأ، ويجب تنظيفها مرة كل اسبوع أو مرتين على حسب عدد الحيوانات المقيمة فى كل قفص . ولتنظيف الأقفاص عند أعدادها لإى تجربة أو للنظافة الدورية لابد من خلوها من الحيوانات وتنظيفها بمحلول صابون ساخن hot soap solution عن طريق الحك بفرشاه مثلاً أو نقعها فى محلول Na_3PO_4 ساخن ، وأخيراً تشطف بماء ساخن ثم بماء بارد .

حيوانات التجارب Experimental animals

أولاً : الفئران البيضاء الكبيرة Rats

تختار لتجارب التغذية سلالات مختارة من الفئران الألبينو أو المنقطة (رقطاء أبيض فى أسود) albino or piebald rats فهى حيوانات ممتازه لهذا الغرض ، أما الفئران السوداء black rats فهى مناسبة أكثر لدراسة الترخينة الغير ملونة achromotrichina (دودة تصيب أمعاء الإنسان وبعض الحيوانات) . و ظروف نمو الفئران البيضاء white rats بسيطة وهذا عند مقارنتها بالفئران ذات الفرو الأسود .

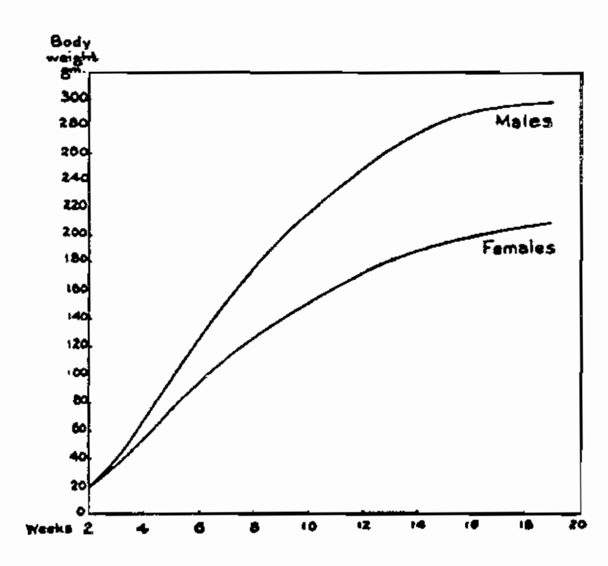
فترة النمو Growth Period : -

فترة نمو الفئران ممتدة لأكثر من حوالى ٣٠٠ يوم (شكل ٣) ، وامتداد او أتساع حياتها يبلغ حوالى ٣ أعوام ، وعلى ذلك فدورتها cycle خلال حياتها يفوق الأجناس البشرية بحوالى ٣٠ مرة (عدد الولادات وخلافه) . وعند مقارنتها بأجناس أخرى فان معدل النمو قبل البلوغ فى الإنسان the rate of prepuberied growth of man يكون أبطء . وتتكاثر الفئران بسرعة ، وهى ذات بطن واسعة large litters (أى عدد الحيوانات التى تلدها أنثى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفئران فى المرة الواحدة كبير جداً ويبلغ حوالى ٦ فى المتوسط) وذلك يسمح بدرجة عالية للتحكم التجريبى experimental control . وهى تتطلب غذاءاً قليلاً little food ، وعلى ذلك فهى اقتصادية economic لدراسة أعراض النقص الغذائية المتعددة . والفأر الابيض ذات مناعة ضد الاسقربوط ، وعلى ذلك فإنه يجب استخدام أنواع أخرى غيرها لدراسة هذه الحالة. هذا، وكان للاختلافات فى متطلبات أنواع الحيوانات المختلفة (الفئران غير الكتاكيت) الفضل الكبير فى اكتشاف الصور المتعددة لفيتامين « د » وفيتامين ب المركب .

يتحقق النضوج الجنسى sexual maturity فى الفئران بعد حوالى ٧٥ يوم ، ولكن يجب ألا يتم التزاوج لغرض التكاثر حتى عمر حوالى ١٠٠ يوم . ويمكن حبس ذكر male واحد مع ٣ أناث females فى قفص واحد . ويجب تنظيم عزل isolate الأناث الحوامل pregnant قبل الولادة ، وأن لم يكن هذا ممكناً فتوضع أنثى واحدة فى القفص مع الذكر . فترة الحمل gestation period حوالى ٢٢ يوم وتفطم wean الصغار عندما تبلغ ٣ - ٤ أسابيع من الولادة ، وإذا كان عدد الحيوانات المولودة فى البطن الواحدة كبير (ازيد من ٨ حيوانات) فيجب ان يختصر أو يقلل لثمانية حيوانات للمحافظة على الأم ووقايتها وفى نفس الوقت لانتاج فئران قوية .

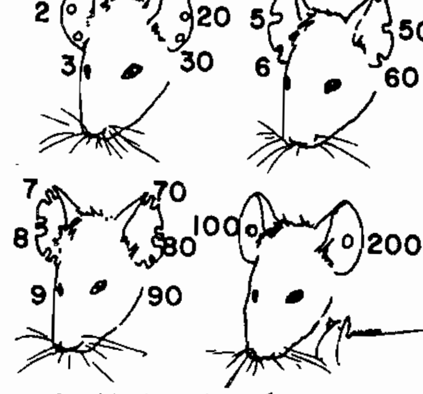


شكل (٣) منحنيات النمو الطبيعية لذكور وأنثات الفئران الألبينو

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

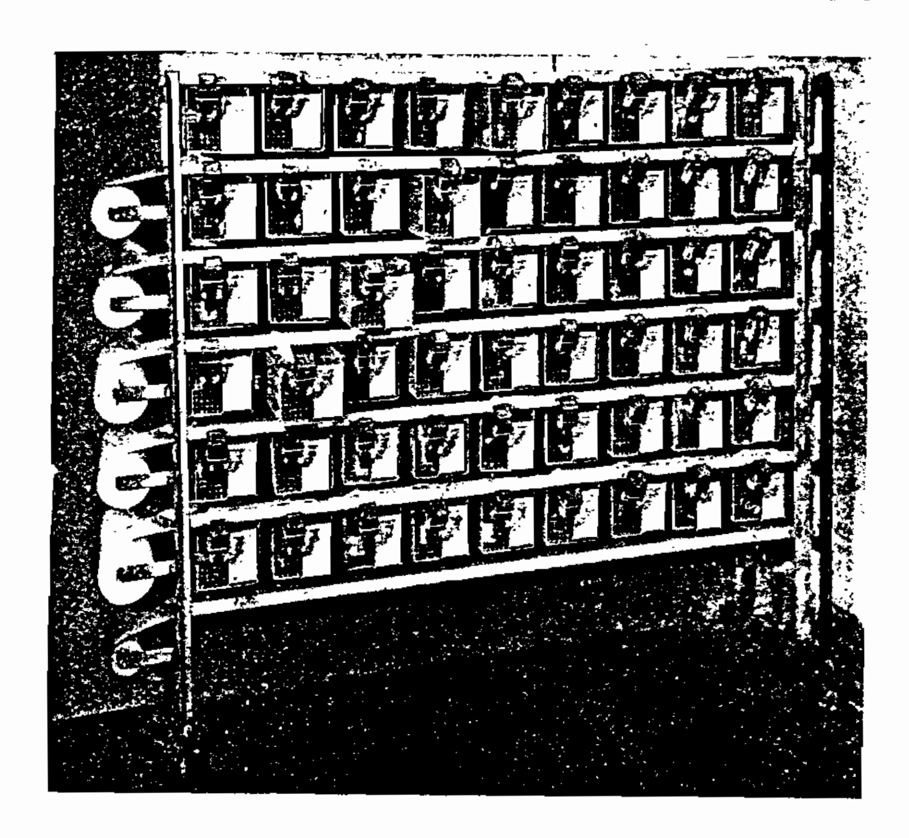
واذا قسمت الحيوانات المولودة في أقفاص مصنوعة من سلك شبك wire mesh cages فيجب أن تقفل فتحة الشبك mesh عن ١/٢ بوصة ، وتجهز الأقفاص بورق ممزق أو سليفان أو نشارة خشب لكى تنام عليها الحيوانات أو تبنى منها أعشاش تأوى اليها . ولتعليم marking الفئران يمكن صبغ stain فرائها fur بصبغات dyes مثل حمض البكريك picric acid أو أزرق المثيلين methylene blue ، أو بتعليم الأذن بأنواع من الأكلاشيهات cuts فى كل أذن . وعن طريق تلك العلامات التى تعلق فى الأذن هناك مدى واسع من الترقيم من الصفر وحتى رقم ٩٩ . ويستخدم الآن الترقيم الكودى عن طريق ثقب وحز الأذن - ear natch punch code لتمييز القوارض عن بعضها البعض . ويمكن بهذه الوسيلة الترقيمية ترقيم الحيوانات إلى مدى واسع جداً من الأرقام ، وشكل (٤) يوضح طريقتى الأكلاشيهات وثقب وحز الأذن لترقيم القوارض . وعند تربية breeding الفئران للأغراض الكبيرة (نطاق تجارى) يمكن استخدام نظام المستعمرات الصغيرة small colonies وهى مجموعة من الأقفاص فوق بعضها مزودة بأدراج وزجاجات ماء خارجية للشرب outside water bottles وتربى فيها الفئران سواء كل فأر بمفرده individual أو فى مجموعة (فى حاله الأم وأولادها) . وعادة ما تكون هذه الأقفاص مزودة ببكر لجمع وازالة نفايات الفئران (شكل ٥) ، مع إن الصوانى الصلب الغير قابلة للصداء stainless stell trays والطبقات السميكه من ورق الجرائد هى الأفضل فى بعض الحالات .

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9



شكل (٤) ترقيم القوارض بطريقة الأكلاشيهات وبطريقة كود ثقب وحز الأذن

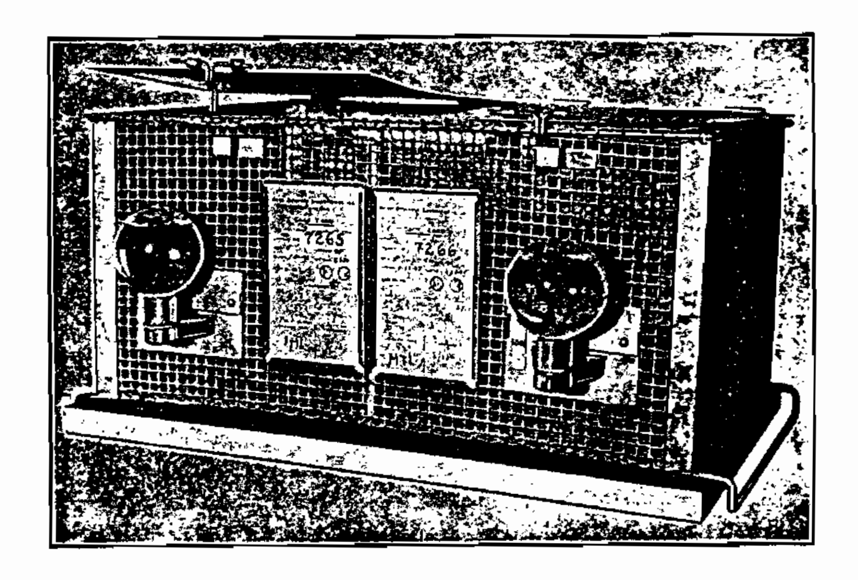
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (٥) بطارية أقفاص فئران ذات النوع المعلق

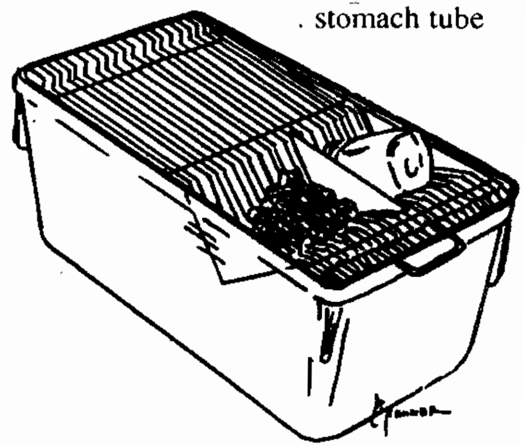
اما فى حاله تربية الفئران على نطاق ضيق ، فيمكن العناية بها فى أقفاص تربية صغيرة مزودة بخزانات الماء وبحاجز متحرك يمكن أزالته ليكون هناك قفص أكبر للتزاوج وعند وضعه يكون هناك قفصين منفصلين ، ومزود أيضاً بحوض منزلق . وشكل (٦) يوضح هذا النوع من الأقفاص . وعندما تبدأ التجربة العملية على الفئران فإنه بالطبع تنقل الحيوانات إلى أقفاص فردية (تسع لفأر واحد) (شكل ٧) وهذه الأقفاص قد تكون مصنعة كلها من السلك وذات قاعده متحركة false bottom لتقلل النفايات إلى أدنى حد . وهذه الأقفاص سهلة التعقيم عند أطعام fed الفئران علائق مجهزة خصيصاً specially prepared diets ، ويجب وضع الطعام فى كوب طعام خاص food cup بشرط ألا يبعثر الطعام حتى نحصل على معلومات data أكثر دقة عن استهلاك الطعام . والمناسب لهذا الغرض برطمان jar مرهم ذات غطاء بلاستيك قلاووظ قوى ذات فتحة مناسبة ولايسمح بفقد الغذاء . وهذا الأناء jar سعة ٣ – ٤ أوقية (أنظر كوب الطعام food cup داخل القفص

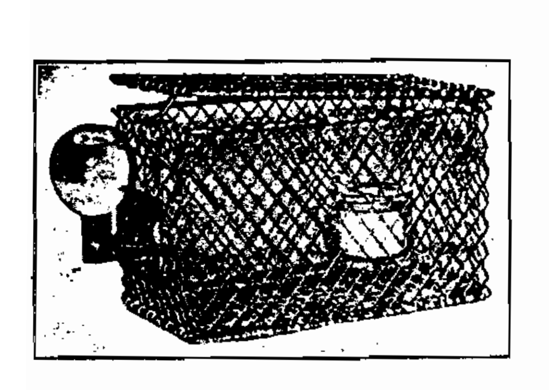
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (٦) أقفاص تربية الفئران الفردية

(شكل ٧ أ) . هذا ، ويستخدم الآن طراز حديث من الأقفاص يسمى الصندق الدولابى أو المبيطر shoe - box لأيواء القوارض المعملية (شكل ٧ب) . وفى حالة التجارب الحيوية والتى يصعب فيها إعطاء الحيوان مادة معينة وبكمية معينة مع الغذاء أو الشراب (الإضافات السائلة أو الزيوت) ، فإنها تعطى عن طريق الفم بواسطة حقن خاصة ذات مواصفات خاصة ومثبت فيها أبرة needle ملساء وغير حادة حتى لا تجرح الحيوان وتسمى بالأنبوب المعدى stomach tube .





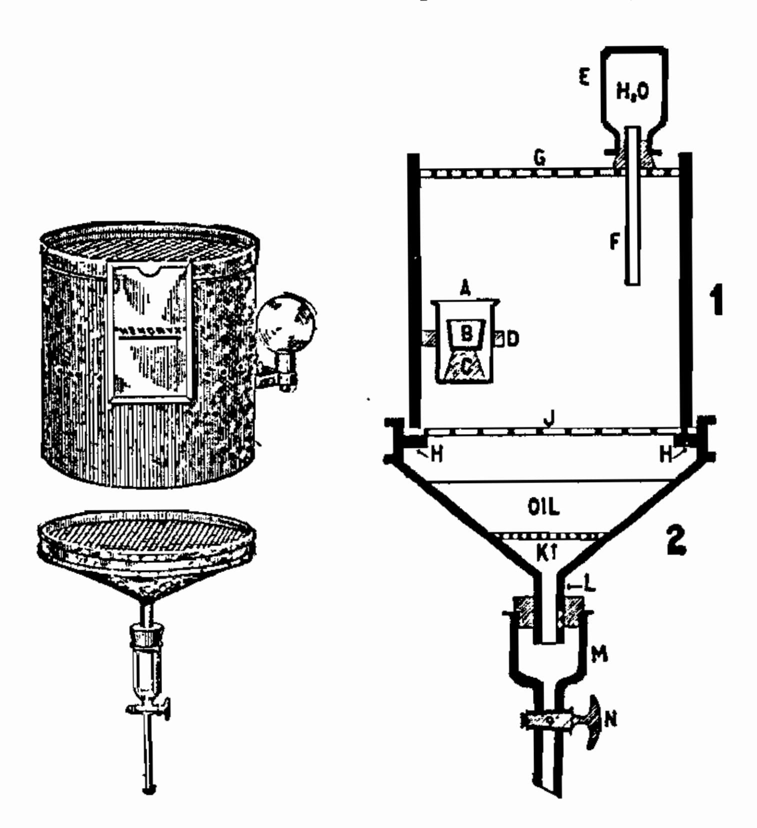
شكل (٧) نموذجين لأقفاص الفئران التى تسع حيوان واحد

أ - قفص مصنع من السلك　　　　ب - قفص من الطراز shoe - box

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تجارب الميزان الغذائى Nutritional balance experiments : -

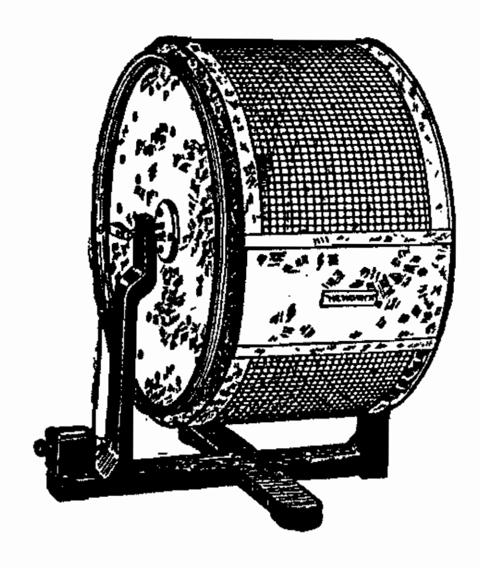
فى هذا النوع من التجارب يكون من الضرورى تتبع كل ما يتناوله الحيوان in put وكل ما يفرزه أو يخرجه out put ، لذلك تستخدم أقفاص خاصة تسمى أقفاص التمثيل الغذائى حيث يمكن بهذه الأقفاص فصل البول عن البراز وتجميع البول urine بمفرده والبراز feces فى جزء آخر ، وشكل (٨) يوضح هذا النوع من الأقفاص .



شكل (٨) قفص التمثيل الغذائى للحيوانات الصغيرة (شمال)
ومقطع طولى فيه (يمين)

أما فى حالة تجارب تتبع نشاط الحيوان فتستعمل أقفاص النشاط activity cages لدراسة النشاط الإختيارى للحيوان ، وهذه الأقفاص تكون معلقة على بكر لكى تصبح حرة الحركة وتتيح للحيوان الجريان داخلها ، وشكل (٩) يوضح قفص النشاط .

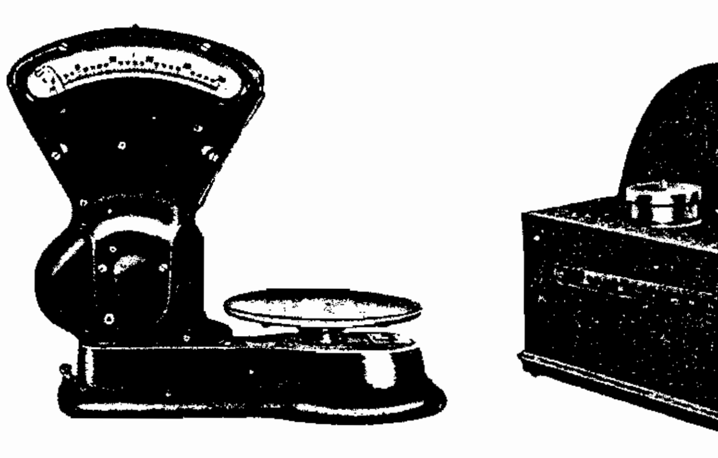
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

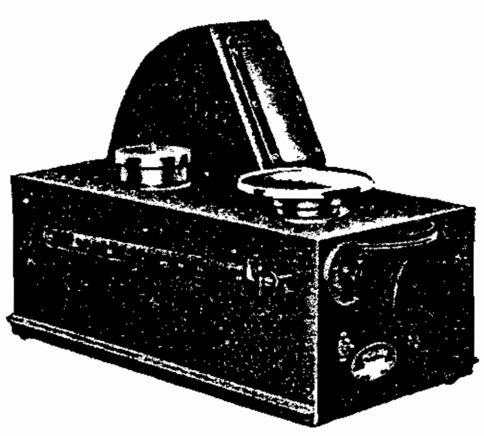


شكل (٩) قفص النشاط الاختيارى للفئران

وزن الحيوانات : -

يمكن وزن الفئران على ميزان زنبركى ، ولكن لنتائج أكثر دقة تستعمل موازين حساسة ذات سعات مختلفة ٢٥٠ - ٥٠٠ - ١٠٠٠ جم (شكل ١٠) وهذه الموازين مناسبة لوزن أوانى الطعام أيضاً .





شكل (١٠) نموذجين للموازين المستخدمة فى وزن الحيوانات الصغيرة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التسجيل : -

تسجل الأوزان أسبوعياً weakly أو نصف أسبوعياً semiweakly في صورة sheets كما في شكل (١١ ، ١٢) ، ويمكن استعمال كارت النمو growth chart المعدل كمـا في شـكل (١٣) حيث يتم تنسيق تقسيم الزمن إلى أيام أو أسابيع .

FOOD RESEARCH LABORATORIES, INC.
NEW YORK CITY
FOOD CONSUMPTION
VITAMIN D ASSAY No.__________

Date | Rat No. | Diet # | Wt. in Grams | No. of Days

شكل (١١) نموذج لكارت استهلاك الغذاء

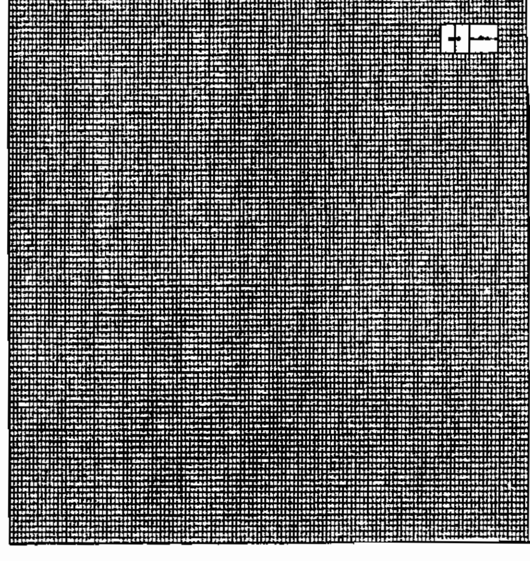
FOOD RESEARCH LABORATORIES, INC.
NEW YORK CITY
VITAMIN D ASSAY

FINDINGS AT AUTOPSY

GROSS PATHOLOGY

شكل (١٢) نموذج لصحيفة تسجيل نتائج تقدير فيتامين د

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (١٣) نموذج لكارت منحنى نمو حيوانات التجارب

التربية والعلائق Breeding and stosck diets : -

عند تربية الفئران لأغراض لا تتطلب تحكم دقيق فى تغذيتها ، فإنه يمكن تغذيتها على عليقة مختلطة mixed diet تتكون من فضلات المائدة النظيفة clean table scraps و خبز ولبن أو dog biscuit (فى أمريكا) مضافاً إلى اللبن أو خضروات طازجة مثل الجزر أو الخس مرة أو مرتين أسبوعياً .

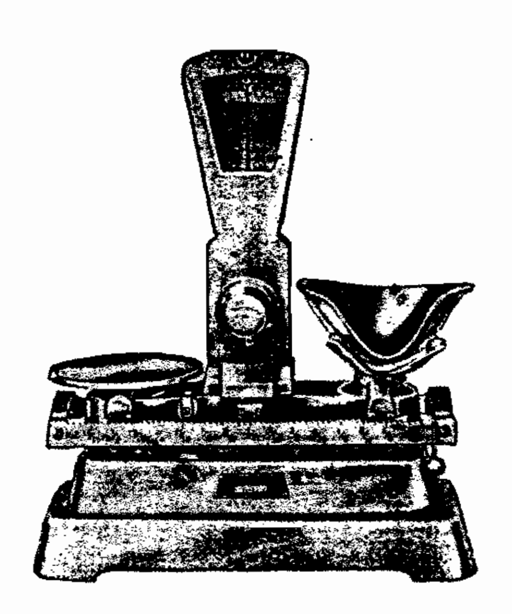
وهناك علائق جاهزة تباع تجارياً مجهزة لذلك ، ويمكن استعمال أيضاً مخلوط أطعمة الدواجن أو وجبة العجل calf meal .

العليقة المصنعة المتزنة Balanced synthetic diet : -

فى الأبحاث الغذائية الدقيقة فإنه من الضرورى استعمال عليقة مجهزة كاملة متماثلة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تماماً وذات فاعلية عالية لعدة أجيال generations من الفئران . ويمكن استعمال ميزان كما هو موضح فى شكل (١٤) لتحضير هذه العلائق .



شكل (١٤) نموذج لميزان حساس لوزن العلائق التجريبية

تعريفها : - هى عبارة عن عليقة حيوانية لازمة للنمو الكامل لهذه الحيوانات واستمرار هذا النمو بصورة طبيعية بدون ظهور أى عرض من أعراض نقص التغذية . وتكون محتويات العليقة معروفة كمياً حسب المكونات الداخلة فيها ، وبعد تجهيزها يتم تقدير كل مكون فيها (كربوهيدرات ، بروتينات ، دهون ...... إلخ) .

ويتوقف تركيب مكونات العليقة وكميتها على عمر الحيوان ونوع الحيوان والغرض من الدراسة . ويحتوى مخلوط العليقة المصنعة فى أبحاث التغذية للفئران على مخلوط من الأملاح الغير عضوية inorganic salt mixtures ذات تركيب مشابه أو مقارب لتحليلها فى اللبن أو البول ، كما تحتوى أيضاً على مخلوط من الفيتامينات اللازمة لتمام النمو واستمراره ، هذا بالاضافة إلى وجود العناصر الغذائية الأخرى بكميات محسوبة ومدروسة (بروتين - كربوهيدرات - دهون) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أهميه استخدام العليقة المصنعة فى تجارب التغذية : -

١ - دراسة أعراض النقص (فيتامينات - أملاح - بروتين .... الخ) على الحيوانات .

٢ - دراسة تأثير استبدال أحد مكونات العليقة بأضافات أخرى مثل استبدال الكازين بفول الصويا .

٣ - دراسة تأثير السعرات الكلية فى العليقة على معدل النمو .

٤ - دراسة تأثير الاضافات الغذائية المختلفة (مثل الألوان الغذائية) ، أو بعض المواد الكيميائية (مثل الادويه أو المبيدات)، أو زيادة بعض العناصر الغذائية (مثل حالات زيادة الفيتامينات hypervitaminosis) . ويوضح جدول (٤) تركيب العليقة المصنعة للفئران البالغة طبقاً لـ (Hegested et al ., 1941 and Campbell , 1961)

وتخلط هذه المكونات جيداً بطريقة خاصة ، ثم تحلل حتى يمكن معرفة كمية ونوع كل مكون فيها بالضبط. وتعطى العلائق للحيوانات بعدة طرق وهى : -

١ - Ad libitum diet : - وفيها يوضع الغذاء أمام الحيوانات وتتناوله كيفما تشاء وفى إى وقت تشاء .

٢ - Meal diet : - وفيها يوضع الطعام أمام الحيوانات فى صورة وجبات (٣ أو ٤ وجبات يومياً) ، أما باقى اليوم فلا يوجد أمام الحيوانات طعام .

٣ - Orally : - وفيها يتم حقن الحيوان بمحلول متجانس من العليقة عن طريق الفم من خلال أنبوبة التغذية stomach tube ، وهذه تعبر عن الغذاء الفعلى الذى وصل لمعدة الحيوان . ولا تتم هنا عملية مضغ ، أما الطريقتين الأوليتين فيتم فيهما مضغ للطعام .

وعادة ما يقدم الماء للحيوان ad libitum فى زجاجات خاصة .

ومن هذه الظروف المحكمة يمكن : -

١ - معرفة كمية الغذاء المأكول يومياً food intake .

٢ - معرفة أستجابة جسم الحيوان للمعاملة تحت الدراسة بقياس الزيادة فى وزن الجسم مثلاً Body weight gain .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣ – يمكن معرفة دور كل عضو من أعضاء الجسم وأستجابته لهذه المعاملة ، كما يمكن ايجاد العلاقة الفسيولوجية لبعض الأعضاء (وزن الأعضاء مثلاً) .

هذا ، وتتعدد أنواع الدراسات على حيوانات التجارب .

Diet composition for adult rat

1 - Carbohydates .... as Sucrose 80%
2 - Protein .... as Casein 10%
3 - Fats .... as Com oil 5%
4 - Salt mix. 4%
5 - Vit. mix. 1%

Salt mix .	
NaCl	139 g
KI	0.79 g
$KH_2 PO_4$	309 g
$MgSO_4$	57.3 g
$CaCO_3$	381.4 g
$FeSO_4$	27 g
$MnSO_4$	4 g
$CoCI_2$	0.032 g
$ZnSO_4$	0.548 g
$CuSO_4$	0.477 g

Vit . mix	
Vit . A	2000 IU
Vit . D	200 IU
Vit . E	10 IU
Vit . K	0.5g
PABA*	10g
Inositol	10g
Nicotinamide	4g
Ca. Pantothenate	4g
Riboflavin	0.8 g
Thiamine	0.5 g
Pyridoxine HCI	0.5 g
Folic acid	0.2 g
Biotin	0.04 g
Vit . B_{12}	0.003 g

* PABA : Para Amino Benzoic Acid

جدول (٤) تركيب العليقة المتزنة للفئران البالغة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تركيب العليقة الأساسية لتجارب التقييم الحيوى للبروتينات : -

في أحيان كثيرة يكون تركيب الأحماض الأمينيه للبروتينات تقريباً شبه متكامل ومناسب لتغذية الإنسان أو الحيوان عليه ، ولكن عند التغذية عليه يعطى نتـائج غير متوقعة (سلبية) . لذلك من المهم اجراء تجارب عليه لتقييمه حيوياً ، ويسمى هذا النوع من التجارب Biological evaluation of protein quality . وتستخدم في هذه التجارب فئران (ذكور) مفطومة عمرها ٢١يوم وتغذى على عليقة متزنة balanced diet لمدة أسبوع آخر وعندما يبلغ عمرها ٣٠ يوم تغذى على عليقة أساسية basal تحتوى على كل العناصر الغذائية اللازمة للفئران فيما عدا البروتين ، ويضاف إليها البروتين تحت الدراسة ويكون تركيزه في العليقة النهائية بنسبة ١٠٪ وتجهز بنفس الطريقة كما في العليقة المتزنة . وتقدر نسبة البروتين ٪ فى العليقة بعد تجهيزها وفى نصف فترة التجربة . أما الفئران الكونترول فتتغذى على عليقة متزنة كاملة تحتوى على الكازين كمصدر للبروتين . وأثناء مراحل التغذية تسجل التقديرات الخاصة بالتقييم الحيوى للبروتين مثل الزيادة في وزن الجسم ، وكمية المأخوذ من الغذاء food intake وميزان النتيروجين .... الخ . وتستمر التجربة إما لفترة قصيرة (شهر أو شهرين) أو لمدة أطول ، وقد تستغرق خمسة شهور أو أكثر . ومما هو جدير بالذكر ، يلزم لهذه التجارب أيضاً تقديرات حيوية أخرى مثل وظائف الكلى ووظائف الكبد وغيرها من الاختبارات وجدول (٥) يحدد تركيب العليقة الأساسية لتجارب التقييم الحيوى للبروتين طبقاً لـ (Fetuga et al ., 1973) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Ingredients	%
Corn starch	65.0
Glucose	5.0
Sucrose	10.0
Non-nutritive cellulose	5.0
Groundnut oil*	10.0
Mineral supplement	4.0
Vitamin mixture	1.0

* The groundnut oil used in these trials were of commercial grade produced by P. S. Mandrides & Co. Ltd, Kano in Northern Nigeria.

Composition of the mineral and vitamin mixes are as follows:

Mineral mix (Miller)[19]	Weight (g)	Vitamin mix (Miller)[19]	
Calcium phosphate	60	Thiamine (HCl)	0.06 mg
Sodium chloride	25	Calcium Panthothenate	1.2 g
Potassium chloride	15	Nicotinic acid	4.0 g
To this was added 2 g of minor mineral salts containing per	100	Inositol	4 P g
Hydrated iron citrate	30	*Para*-amino benzoic acid	12.0 g
Magnesium carbonate levis	30	Biotin	0.04 g
Copper carbonate basic	7	Folic acid	0.04 g
Zinc carbonate	3	Cyanocobalamin	0.001 g
Sodium iodate	0.1	Choline chloride	12.0 g
Sodium flouride	0.1	Corn starch	to 1 kg

جدول (٥) تركيب العليقة الأساسية لتجارب التقييم الحيوى للبروتينات

ثانياً : خنازير غينيا Guinea Pigs (Cavies)

سلالة خنزير غينيا المناسبة لأبحاث التغذية هى English short smooth haired variety. ويجب أن تعيش خنازير غينيا بعيداً عن التيارات الهوائية وفى أقفاص جافه ، وتفضل أقفاص ذات قاعدة مثبتة ومتحركة (كاذبة) وتزود بنشارة أو رقائق من الورق . ويجب تجفيف الأقفاص من وقت لآخر وإضافة قش جاف لها . وهذه الحيوانات عشبية ويمكن تغذيتها على تبن أو قش نظيف وحبوب grains (دقيق شوفان oat meal ، و نخالة bran وقمح ...... الخ) مدعمة بخضروات طازجة (جزر ، بنجر ، ألفا ألفا ، خس ، كرفس ... الخ)، ويجب فحص الخضروات الطازجة وصحتها قبل أضافتها الى الخنازير لأن هذه الحيوانات تنبذ الطعام الفاسد ولا تأكله . ولابد من احتواء العليقة على دهون (مثل زيت كبد الحوت codliver oil) ويجب عدم تغذيتها عليه عندما يتزنخ . وكثيراً ما ينصح باضافة

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الخميرة الجافة dried yeast إلى مخلوط الحبوب . وتباع مخاليط علائق خنازير غينيا جاهزة فى الأسواق .

معظم الباحثون يشترون خنازير غينيا من الأسواق ، وذلك ليس مقبولاً علمياً حيث يكون تاريخها الغذائى ليس منظماً ، ولكن يجب عليهم شرائها من مربيين موثوق فيهم ، ويجب الحذر جدا عند شراء ونقل وحمل هذه الحيوانات حتى لا تصاب بأى عدوى عند تغيير ظروفها .

تلد خنازير غينيا حوالى مرة كل ٣ - ٤ شهور، وتبدأ فترة الحمل ابتداء من عمر ٦٥ - ٧١ يوم ، ويجب ألا يبدأ تزاوجها قبل عمر ٣ شهور . وفترة الرضاعة تستمر حوالى ٢ - ٣ أسابيع .

ثالثاً : الفئران البيضاء الصغيرة White Mice

الفأر الابيض الصغير white mouse يستعمل بنجاح فى دراسات التغذية ، ومميزات أو محاسن هذه الفئران تتضمن قله أو صغر المتطلبات الغذائية ، و نمو أكثر سرعة more rapid growth ، وكثرة التوالد أو التكاثر . المتطلبات الغذائية للفأر الابيض الصغير تتماثل مع تلك اللازمة للفأر الأبيض الكبير ، لكن ينصح بمحتوى بروتين عالى . ولكن يفضل الـ rat عن الـ mouse فى دراسات التغذية لأنه أكثر تحملاً بالمقارنة بالـ mouse ، وأقل عرضه للعدوى بالأمراض الثانوية ، ولا يتأثر سريعاً بتغيير درجات الحرارة . أما الـ mouse فيلزمه فيتامين جـ للنمو الطبيعى .

رابعاً : الهامستر Hamster

تستخدم هذه الحيوانات فى تجارب الطفيليلات المختلفة مثل البلهارسيا والأمراض الفيروسية . وهذه الحيوانات ثبت إنها أكثر حساسية عن الفئران الصغيرة ، وفاعلية التجارب عليها فى معامل الأبحاث غير ثابتة إذا قورنت بالحيوانات الأخرى ، لذلك نجد إنه قليل الأستعمال . أما من الجهة التشريحيه فنجد أنه قريب الشبة من الفأر الأبيض الكبير . ومن عاده هذه الحيوانات أنها تحب النوم نوماً عميقاً وخصوصاً إذا كان هناك أنثى معها صغارها، ومن عادتها أيضاً أنها تأكل برازها وهذه عادة طبيعية حتى ولو أستعملت أرضية من السلك الشبكى فى أقفاصها، لذلك ينهى عن أستعمالها فى تجارب التغذية والميزان الغذائى .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

خامساً : الأرانب Rabbits

تعتبر الأرانب حيوانات تجارب نموذجية فى كثير من الأبحاث خصوصاً المتعلقة منها باللقاحات وأمراض تصلب الشرايين ، فهى مناسبة لهذا النوع من الأبحاث لسهولة أحداث أمراض تصلب الشرايين atherosclerosis فيها وأرتفاع الكولستيرول والليبيدات فى الدم . كما تستخدم أيضاً فى مجالات الأبحاث البكتريولوجية والفسيولوجية والتغذية والابحاث المتعلقة بالهرمونات وانتاج الأمصال واللقاحات . والأرانب حيوانات آكلة للعشب ذو معدة واحدة ، إلا إن الأعور بها ذو حجم كبير وذلك لقيام البكتريا الموجودة بها بتحليل وهضم المواد السليلوزية . وهناك أنواع كثيرة من الأرانب ، تستخدم كلها تقريباً فى الأبحاث . ولكن هناك أنواع وسلالات شائعة الاستعمال فى أبحاث معينة نذكر منها على سبيل المثال السلالات الكبيرة large breeds ويبلغ وزنها من ٦,٤ إلى٧,٣ كيلو جرام أو ما يعادل ١٤ إلى ١٦ رطل ومنها الشينشيلا الكبيرة giant chinchilla . السلالات متوسطة الحجم medium - sized ويبلغ وزنها من ١,٨ إلى ٦,٤ كيلو جرام أو ما يعادل ٤ إلى ١٤ رطل ومنها الأرانب النيوزلاندى newzealnd rabbits . السلالات الصغيرة small ويبلغ وزنها من ٠,٩ الى ١,٨ كيلو جرام أو ما يعادل ٢ إلى ٤ رطل ومنها سلالات dutch و polish . والسلالة النيوزلاندى الأبيض مناسبة لأنتاج اللحم والأبحاث .وتربى الأرانب إما فى حظائر معينة أو فى أقفاص مصنوعة من الحديد أو الخشب والسلك .

سادساً : الجربيل أو العضل Gerbil

وهو حيوان من فصيلة الفأر ، يشبه فى شكله الفأر ويبلغ وزن الذكر البالغ منه حوالى ١٠٠ جم والأنثى حوالى ٨٥ جم . ويتميز الجربيل المنغولى mangolian gerbil بإنه فضولى curious ، تقريباً عديم الرائحة odorless ، وودود friendly ، وسلوكه التزاوجى أحادى monogamous (يتزوج الذكر بأنثى واحدة) .

حيوانات الجربيل نشطة ، تعيش فى جحور burrowing ، وهى حيوانات اجتماعية social لها دورات من النشاط والراحة اثناء اليوم والليل وتستهلك كميات متساوية من الطعام فى أثناء النهار والليل . وهذه الحيوانات مناسبة للأبحاث المتعلقة بزيادة الليبيدات فى الدم أو فى الكبد hepatic lipidosis والحصوات المرارية gallstones والتى يمكن احداثها بتغذية هذه الحيوانات على علائق عالية الدهون high - fat diets ، ولكنها غير مناسبة لأبحاث تصلب الشرايين .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

سابعاً : الكلاب Dogs

استخدمت الكلاب فى تجارب التغذية على مخلوط غذاء مصنع نقى وكتب لهذه التجارب النجاح . وأساس ذلك إن العليقة تتركب من مخلوط من المواد الغذائية المنفردة والتى تمد الجسم بكل العوامل الضرورية لغرض التغذية عدا عامل غذائى واحد single dietaey factor وهو المتغير فى مخلوط العلائق المختلفة (كما هو متبع فى تجارب التغذية) وأمكن تطبيق ذلك على فيتامين ب المركب كعامل متغير ، وتتركب العليقة من : -

١ - بروتين protein مناسب فى النوع والكمية.

٢ - كربوهيدرات ودهون لتمد الجسم بالطاقة الكافية .

٣ - أملاح معدنية mineral salts ، كما فى الجدول (٦) ، فهى مناسبة فى النوع والكمية .

٤ - كمية كافية من فيتامين أ .

٥ - طعام خشن Roughage

٦ - ماء .

SALT MIXTURE (KARR, 1920)		SALT MIXTURE (COWGILL)	
NaCl	10 g.	NaCl	38.0
Ca lactate	4 g.	Mg citrate	32.5
Mg citrate	4 g.	KH_2PO_4	12.2
Fe citrate	1 g.	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	7.8
Iodine in KI (Lugol's solution) a few drops		KCl	7.0
		Fe citrate	1.8
		KI	0.5

Karr's salt mixture, when fed along with bone ash on the basis of 0.2 g. and 0.4 g., respectively, per kilo unit of food, the latter serving as a source of phosphate, has given successful results with the dog during periods lasting over five months.

Where 0.4 g. of agar-agar per kilo unit is used as a source of roughage, Cowgill's salt

جدول (٦) الأملاح المعدنية المناسبة لتغذية الكلاب

إن متطلبات الطاقة اللازمة للكلاب عادة ما تكون عالية (جدول ٧) ، وتقتصر الطاقة إلى ٦٠ - ٧٠ كالورى / كجم من وزن الجسم ، فمثلاً فى تجارب دراسة نقص أحد فيتامينات ب المركب (العامل المتغير) يتم التغذية عليه منفرداً separately (فى صورة خميرة جافة مثلاً) ويمكن اضافة إى مخلوط فيتامينى مخلق أو صور متنوعة من فيتامين ب منفرده ، كما يجب ملاحظة إن اضافة كميات سكر زيادة عن اللازم فى العليقة يسبب اسهالاً للحيوانات .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Kilo Unit of Casein Foo *

	Amount	Calories	Percentage
	g.		
Casein (81.9 per cent pure, 12.7 per cent N)	6.3	20.8	37.6
Sucrose	5.84	23.4	34.9
Lard	2.83	25.5	17.0 } 24.0
Butterfat	1.17	10.5	7.0 }
Bone ash	0.40	..	2.3
Salt mixture†	0.20	..	1.2
Totals	16.74	80.2	100.0

* This kilo unit contains 80 calories, 45 per cent of which are furnished by fat, and 0.8 mg. of nitrogen.
† See footnote 29, p. 1275.

جدول (٧) متطلبات الطاقة اللازمة للكلاب

لذا فإضافة الحبوب cereals (وليس نشا نقى) هو أحسن مصدر للكربوهيدرات . وليس من الضرورى مد الكلاب باللحم ، حيث إنها غير ضرورية لو كانت العليقة كافية فيما يتعلق بالبروتين والمغذيات nutrients الأخرى . كما إن أستخدام عليقة معينة بأستمرار يسبب ضعف شهية الكلاب وقلة الرغبة فى الأكل .

ثامنا : حيوانات أخرى Other aminals

تستخدم حيوانات أخرى خلاف السابق ذكرها مثل القطط cats و الكتاكيت والدجاج .... إلخ ، وذلك على حسب متطلبات التجربة والغرض من أجراء البحث العملى .

هذا ويتم اختيار نوع الحيوان ، و وزن جسمه ، وعمره ، و جنسه ... إلخ ، وذلك على حسب نوع التجربة والغرض من إجراء البحث العملى ، فمثلاً فى تجربة التغذية وقياس القيمة البيولوجية لبعض المواد الغذائية ، تختار ذكور حيوانات صغيرة (فئران بيضاء كبيرة أو صغيرة) ، وفى تجارب قياس بعض الفيتامينات التى لها علاقة بالخصوبة مثل فيتامين هـ تختار اناث فئران بالغة .

ومما هو جدير بالذكر، إن القيم الفسيولوجية physiological values لهذه الحيوانات أمراً هاماً جداً للباحثين والعاملين فى هذا المجال ، فهى بمثابة المرجع والدليل على صحة وسلامة الحيوانات . والجداول (٨ - ١٣) تعرض هذه القيم ، مع مراعاة إن هذه القيم قيم تقريبية ومن المحتمل فى بعض الحالات إنها تمثل المدى الطبيعى ، وهذا يرجع إلى إختلاف الأنواع والظروف المعيشية وغيرها من العوامل (Harkness and Wagner , 1989)

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Adult body weight: male	450–520 g
Adult body weight: female	250–300 g
Birth weight	5–6 g
Body surface area (cm^2)	10.5 (wt. in grams)$^{2/3}$
Body temperature	35.9–37.5° C
Diploid number	42
Life span	2.5–3.5 yr
Food consumption	10 g/100 g/day
Water consumption	10–12 ml/100 g/day
GI transit time	12–24 hr
Breeding onset: male	65–110 days
Breeding onset: female	65–110 days
Cycle length	4–5 days
Gestation period	21–23 days
Postpartum estrus	fertile
Litter size	6–12
Weaning age	21 days
Breeding duration,	350–440 days
commercial	7–10 litters
Young production	4–5/mo
Milk composition	13.0% fat, 9.7% protein, 3.2% lactose
Respiratory rate	70–115/min
Tidal volume	0.6–2.0 ml
Oxygen use	0.68–1.10 ml/g/hr
Heart rate	250–450/min
Blood volume	54–70 ml/kg
Blood pressure	84–134/60 mm Hg
Erythrocytes	7–10 × 10^6/mm^3
Hematocrit	36–48%
Hemoglobin	11–18 g/dl
Leukocytes	6–17 × 10^3/mm^3
Neutrophils	9–34%
Lymphocytes	65–85%
Eosinophils	0–6%
Monocytes	0–5%
Basophils	0–1.5%
Platelets	500–1300 × 10^3/mm^3
Serum protein	5.6–7.6 g/dl
Albumin	3.8–4.8 g/dl
Globulin	1.8–3.0 g/dl
Serum glucose	50–135 mg/dl
Blood urea nitrogen	15–21 mg/dl
Creatinine	0.2–0.8 mg/dl
Total bilirubin	0.20–0.55 mg/dl
Serum lipids	70–415 mg/dl
Phospholipids	36–130 mg/dl
Triglycerides	26–145 mg/dl
Cholesterol	40–130 mg/dl
Serum calcium	5.3–13.0 mg/dl
Serum phosphate	5.3–8.3 mg/dl

جدول (٨) القيم الفسيولوجية للفأر الكبير

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Adult body weight: male	900–1200 g
Adult body weight: female	700–900 g
Birth weight	70–100 g
Body surface area (cm^2)	9.5 (wt. in grams)$^{2/3}$
Body temperature	37.2–39.5° C
Diploid number	64
Life span	4–5 yr
Food consumption	6 g/100 g/day
Water consumption	10 ml/100 g/day
GI transit time	13–30 hr
Breeding onset: male	600–700 g (3–4 mo)
Breeding onset: female	350–450 g (2–3 mo)
Cycle length	15–17 days
Gestation period	59–72 days
Postpartum estrus	fertile, 60–80% pregnancy
Litter size	2–5
Weaning age (lactation duration)	150–200 g 14–21 days
Breeding duration,	18 mo to 4 years
commercial	4–5 litters
Young production (index per female)	0.7–1.4/mo
Milk composition	3.9% fat, 8.1% protein, 3.0% lactose
Respiratory rate	42–104/min
Tidal volume	2.3–5.3 ml/kg
Heart rate	230–380/min
Blood volume	69–75 ml/kg
Blood pressure	80–94/55–58 mm Hg
Erythrocytes	4.5–7.0 × 10^6/mm^3
Hematocrit	37–48%
Hemoglobin	11–15 g/dl
Leukocytes	7–18 × 10^3/mm^3
Neutrophils	28–44%
Lymphocytes	39–72%
Eosinophils	1–5%
Monocytes	3–12%
Basophils	0–3%
Platelets	250–850 × 10^3/mm^3
Serum protein	4.6–6.2 g/dl
Albumin	2.1–3.9 g/dl
Globulin	1.7–2.6 g/dl
Serum glucose	60–125 g/dl
Blood urea nitrogen	9.0–31.5 mg/dl
Creatinine	0.6–2.2 mg/dl
Total bilirubin	0.3–0.9 mg/dl
Serum lipids	95–240 mg/dl
Phospholipids	25–75 mg/dl
Triglycerides	0–145 mg/dl
Cholesterol	20–43 mg/dl
Serum calcium	5.3–12 mg/dl
Serum phosphate	3.0–7.6 mg/dl

جدول (٩) القيم الفسيولوجية لخنزير غينيا

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Adult body weight: male	20–40 g
Adult body weight: female	25–40 g
Birth weight	0.75–2.0 g
Body surface area (cm^2)	10.5 (wt. in grams) $^{2/3}$
Rectal temperature	36.5–38.0° C
Diploid number	40
Life span	1.5–3 yr
Food consumption	15 g/100 g/day
Water consumption	15 ml/100 g/day
GI transit time	8–14 hr
Breeding onset: male	50 days
Breeding onset: female	50–60 days
Cycle length	4–5 days
Gestation period	19–21 days
Postpartum estrus	fertile
Litter size	10–12
Weaning age	21–28 days
Breeding duration, commercial	7–9 mo
	6–10 litters
Young production	8/mo
Milk composition	12.1% fat, 9.0% protein, 3.2% lactose
Respiratory rate	60–220/min
Tidal volume	0.09–0.23 ml
Oxygen use	1.63–2.17 ml/g/hr
Heart rate	325–780/min
Blood volume	76–80 mg/kg
Blood pressure	113–147/81–106 mm Hg
Erythrocytes	7.0–12.5 $\times 10^6/mm^3$
Hematocrit	39–49%
Hemoglobin	10.2–16.6 mg/dl
Leukocytes	6–15 $\times 10^3/mm^3$
Neutrophils	10–40%
Lymphocytes	55–95%
Eosinophils	0–4%
Monocytes	0.1–3.5%
Basophils	0–0.3%
Platelets	160–410 $\times 10^3/mm^3$
Serum protein	3.5–7.2 g/dl
Albumin	2.5–4.8 g/dl
Globulin	0.6 g/dl
Serum glucose	62–175 mg/dl
Blood urea nitrogen	12–28 mg/dl
Creatinine	0.3–1.0 mg/dl
Total bilirubin	0.1–0.9 mg/dl
Cholesterol	26–82 mg/dl
Serum calcium	3.2–8.5 mg/dl
Serum phosphate	2.3–9.2 mg/dl

جدول (١٠) القيم الفسيولوجية للفأر الصغير

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Adult body weight: male	85–130 g
Adult body weight: female	95–150 g
Birth weight	2 g
Body surface area (cm^2)	10.5 (wt. in grams) $^{2/3}$
Body temperature	37–38° C
Diploid number	44
Life span	18–24 mo
Food consumption	> 15 g/100 g/day
Water consumption	> 20 ml/100 g/day
Breeding onset: male	10–14 wk
Breeding onset: female	6–10 wk
Cycle length	4 days
Gestation period	15–16 days
Postpartum estrus	infertile
Litter size	5–9
Weaning age	20–25 days
Breeding duration,	10–12 mo
commercial	5–7 litters
Young production	3 mo
Milk composition	12.0% fat, 9.0% protein, 3.4% lactose
Respiratory rate	35–135/min
Tidal volume	0.6–1.4 ml
Oxygen use	0.6–1.4 ml/g/hr
Heart rate	250–500/min
Blood volume	78 ml/kg
Blood pressure	150/100 mm Hg
Erythrocytes	6–10 $\times 10^6/mm^3$
Hematocrit	36–55%
Hemoglobin	10–16 g/dl
Leukocytes	3–11 $\times 10^3/mm^3$
Neutrophils	10–42%
Lymphocytes	50–95%
Eosinophils	0–4.5%
Monocytes	0–3%
Basophils	0–1%
Platelets	200–500 $\times 10^3/mm^3$
Serum protein	4.5–7.5 g/dl
Albumin	2.6–4.1 g/dl
Globulin	2.7–4.2 g/dl
Serum glucose	60–150 mg/dl
Blood urea nitrogen	12–25 mg/dl
Creatinine	0.91–0.99 mg/dl
Total bilirubin	0.25–0.60 mg/dl
Cholesterol	25–135 mg/dl
Serum calcium	5–12 mg/dl
Serum phosphate	3.4–8.2 mg/dl

جدول (١١) القيم الفسيولوجية للهامستر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Adult body weight: male (buck)	2–5 kg
Adult body weight: female (doe)	2–6 kg
Birth weight	30–80 g
Body surface area (cm^2) (See Paget 1965 ref., Chapter 3 bibliography)	9.5 (wt. in grams)$^{2/3}$
Rectal temperature	38.5–40.0° C
Diploid number	44
Life span	5–6 yr or more
Food consumption	5 g/100 g/day
Water consumption	5–10 ml/100 g/day or more
GI transit time	4–5 hr
Breeding onset: male	6–10 mo
Breeding onset: female	4–9 mo
Cycle length	induced ovulator
Gestation period	29–35 days
Postpartum estrus	none
Litter size	4–10
Weaning age	4–6 wk
Breeding duration,	1–3 yr
commercial	7–11 litters
Young production	2–4/mo
Milk composition	12.2% fat, 10.4% protein, 1.8% lactose
Respiratory rate	30–60/min
Tidal volume	4–6 ml/kg
Oxygen use	0.47–0.85 ml/g/hr
Heart rate	130–325/min
Blood volume	57–65 ml/kg
Blood pressure	90–130/60–90 mm Hg
Erythrocytes	4–7 × $10^6/mm^3$
Hematocrit	36–48%
Hemoglobin	10.0–15.5 mg/dl
Leukocytes	9–11 × $10^3/mm^3$
Neutrophils	20–75%
Lymphocytes	30–85%
Eosinophils	0–4%
Monocytes	1–4%
Basophils	2–7%
Platelets	250–270 × $10^3/mm^3$
Serum protein	5.4–7.5 g/dl
Albumin	2.7–4.6 g/dl
Globulin	1.5–2.8 g/dl
Serum glucose	75–150 mg/dl
Blood urea nitrogen	17.0–23.5 mg/dl
Creatinine	0.8–1.8 mg/dl
Total bilirubin	0.25–0.74 mg/dl
Serum lipids	280–350 mg/dl
Phospholipids	75–113 mg/dl
Triglycerides	124–156 mg/dl
Cholesterol	35–53 mg/dl
Serum calcium	5.6–12.5 mg/dl
Serum phosphate	4.0–6.2 mg/dl

جدول (١٢) القيم الفسيولوجية للأرانب

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Adult body weight: male	65–100 g
Adult body weight: female	55–85 g
Birth weight (depends on litter size)	2.5–3.0
Body surface area (cm^2)	10.5 (wt. in grams)$^{2/3}$
Body temperature	37.0–38.5° C
Diploid number-Karyotype	44
Life span	3–4 yr
Food consumption	5–8 g/100 g/day
Water consumption	4–7 ml/100 g/day
Vaginal opening	41 days or 28 g
Breeding onset: male	70–85 days
Breeding onset: female	65–85 days
Estrous cycle length	4–6 days
Gestation period (nonlactating)	24–26 days
Gestation period (concurrent lactation)	27–48 days
Postpartum estrus	Yes-fertile
Litter size	3–7; 5 avg.
Weaning age	20–26 days
Breeding duration,	12–17 mo
commercial	4–10 litters
Litters per year	7 avg.
Average production index	> 1/wk per breeding pair
Respiratory rate	90/min
Oxygen use	1.4 ml/g/hr
Heart rate	360/min
Blood volume	66–78 ml/kg
Erythrocytes	8–9 × $10^6/mm^3$
Reticulocytes	21–54/1000 rbc
Stippled rbc	2–16/1000 rbc
Polychromatophilic rbc	5–30/1000 rbc
Hematocrit	43–49%
Hemoglobin	12.6–16.2 mg/dl
Leukocytes	7–15 × $10^3/mm^3$
Neutrophils	5–34%
Lymphocytes	60–95%
Eosinophils	0–4%
Monocytes	0–3%
Basophils	0–1%
Platelets	400–600 × $10^3/mm^3$
Serum protein	4.3–12.5 mg/dl
Albumin	1.8–5.5 mg/dl
Globulin	1.2–6.0 mg/dl
Serum glucose	50–135 mg/dl
Blood urea nitrogen	17–27 mg/dl
Creatinine	0.6–1.4 mg/dl
Total bilirubin	0.2–0.6 mg/dl
Cholesterol	90–150 mg/dl
Serum calcium	3.7–6.2 mg/dl
Serum phosphate	3.7–7.0 mg/dl

جدول (١٣) القيم الفسيولوجية للجربيل

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

طرق دراسة الفيتامينات Methods of vitamin studies

تتم دراسة الفيتامينات حتى يمكن الوصول إلى ما يلى : -

١ - فائدة هذه المركبات ودورها فى العمليات الفسيولوجية المختلفة (تمثيل غذائى - تكاثر - الوقاية من الأمراض .... إلخ) .

٢ - معرفة تركيبها الكيميائى ومشابهاتها المختلفة وصورها الفعالة النشطة .

٣ - كيفية تحليلها كمياً ووصفياً حتى يمكن الاستفادة بها من مصادرها الطبيعية .

٤ - أعراض نقصها .

٥ - تمثيلها الغذائى (بنائها وهدمها) .

وتتطلب دراسة الفيتامينات الخطوات التالية : -

١ - تعتبر الخطوة الأولى فى دراسة الفيتامينات هى محاولة الوصول إلى أعراض نقصها deficiency symptoms فى حيوانات التجارب المعملية .

٢ - الخطوة الثانية هى الحصول على المادة ذات النشاط الحيوى فى صورة نقية ، ويتم ذلك عن طريق : -

أ - طرق التحليل الكروماتوجرافى المختلفة chromatographic methods .

ب - التقطير الجزئى تحت تفريغ عالى high vacuum molecular distillation .

٣ - دراسة التركيب البنائى لهذه المركبات المفصولة والنشطة حيوياً study of chemical formula .

٤ - اثبات هذا التركيب البنائى عن طريق تخليق الفيتامين وتكسيره synthesis and degradation .

٥ - تخليق مركبات مشابهة ثم دراسة درجة نشاطها الحيوية على الكائن الحى ، ومن ذلك يمكن التعرف على المجاميع الفعالة واللازمة للنشاط الحيوى حتى يتم اثبات العلاقة بين التركيب الكيميائى لها والخواص الفسيولوجية .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

طرق تقدير الفيتامينات Methods of vitamin determination

تعتبر طرق تقدير الفيتامينات من الأشياء الهامة فى دراسة الفيتامينات ،حيث يتم تقديرها فى مصادرها الطبيعية سواء النباتية منها أو الحيوانية ، كما إن لها أهمية خاصة فى الدراسات البيوكيميائية (تقديرها فى الكائن الحى) . وللوصول إلى ذلك لابد من وجود فيتامينات قياسية standard vitamins (كمرجع قياسى) .

كان يتم تقدير الفيتامينات (نشاطها الحيوى) أساساً بواحدات حيوية biological units مثل الوحدات التالية : - rat unit , chick unit , mouse unit

ولكن بعد الحصول على أغلب الفيتامينات فى صورة نقيه pure عبر عنها بوحدات وزنية (وحدات قياسية) مثل : -

International Unit (I. U) الوحدة الدولية

United State Pharmacopia unit (U.S.P)

B.P. Unit .

M. R. C. unit

وبالنسبة لطرق تقدير الفيتامينات فى مصادرها المختلفة فإنه توجد أربعة أنواع من الطرق تختلف عن بعضها البعض فى أساس التقدير ، وهى كما يلى : -

أولاً : الطرق الحيوية Biological Methods(Bioassay)

الأساس الذى تبنى عليه هذه الطرق هو أن لكل فيتامين تأثيرات حيوية خاصة بـه (متخصصة) specific biological effects على الكائنات الحية ، وبقياس هذه الاستجابة الحيوية (تأثير الفيتامين) يمكن تقدير النشاط الحيوى الفعلى للفيتامين كمياً. وتستخدم فى هذه الطرق حيوانات التجارب المعملية السابق الاشارة إليها . هذا ، ولابد من وجود عامل استجابة على حيوان التجارب حتى يمكن أن يقاس به الفيتامين .

عامل الاستجابة Critiria of response : -

هو رد الفعل الطبيعى الناتج من استجابة الحيوان للفيتامين . وقد يأخذ هذا العامل اشكال متعددة مثل النمو العادى للجسم (كما فى فيتامين أ) ، أو النمو الرأسى والأفقى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

للعظام (كما فى فيتامين د) ، أو نمو بعض أجهزة الجسم (كما فى فيتامين هـ) ، أو أنتاج بعض المواد من الكائن الحى كإنفراد الأحماض أو الغازات أو العناصر المعدنية .

وتستخدم الطرق الحيوية كمرجع أساسى ينسب إليه جميع الطرق الأخرى لأنها تقدر النشاط الفيتامينى الفعلى والتى تعجز الطرق الأخرى (كيميائية أوطبيعية) عن تقديرها .

الخطوات الرئيسية العامة لهذه الطرق : -

هناك مجموعة من الخطوات الرئيسية عند تقدير الفيتامينات بهذه الطرق هى : -

١ - تختار الحيوانات من سلالة معروفة النسب ولها نفس العمر والوزن ومرباة على حسب الشروط السابق ذكرها .

٢ - تقسم الحيوانات إلى عدة مجموعات وكل مجموعة تحتوى على العدد الكافى لاجراء التجربة (للتحليل الاحصائى على الأقل ١٠حيوانات فى كل مجموعة) .

وعادة ما يكون هناك هذه المجموعات : -

أ - **المجموعة الأولى** Positive control group : -

وهذه المجموعة تغذى بصورة طبيعية وعلى عليقة كاملة متزنة .

ب - **المجموعة الثانية** Negative control group : -

وهذه المجموعة لا تعطى أطلاقاً الفيتامين المراد دراسته وتقديره حيوياً فى غذائها .

جـ - **المجموعة الثالثة (القياسية)** Standard group : -

وفى هذه المجموعة يتم استنفاذ الفيتامين من جسمها كما فى المجموعة الثانية ، ثم تعطى بعد ذلك كميات معلومة بالضبط من الفيتامين النقى تحت الدراسة ويسجـــل فيها عامل الأستجابة (لعمل المنحنى القياسى) .

د - **المجموعة الرابعة** Unknown group : -

وفيها يتم استنفاذ الفيتامين كما فى المجموعة الثانية ثم تعطى كميات معلومة من العينة المراد تقدير الفيتامين فيها ، ويسجل بعد ذلك عامل الاستجابة المقابل لهذه المعاملة .

٣ - يتم فى كل المجاميع عمل استنفاذ deplating للفيتامين تحت الدراسة عدا المجموعة الأولى . ويتم هذا الاستنفاذ بتقديم عليقة متزنة و لاتحتوى على الفيتامين، ثم تعطى المجاميع الفيتامين أو العينة تحت الدراسة كما سبق ذكره .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤ – يتم رسم العلاقة البيانية بين عامل الاستجابة وكمية الفيتامين من دراسة المجموعة القياسية، وعادة ما يكون الرسم الناتج فى صورة منحنى قياسى standard curve .

٥ – ومن نتائج المجموعة الأخيرة unknown group يسجل عامل الأستجابة المقابل للعينة المعطاة للحيوانات ، ويقارن بالمنحنى القياس ومنه تحسب كمية الفيتامين الفعلية فى العينة المعطاة لها .

هذا، ويتم استنفاذ الفيتامين عادة من حيوانات التجارب النامية الصغيرة young animals أو بعد فطامها Weanting animals . ويجب الحرص الشديد ومرعاة النظافة التامة فى هذه التجارب حتى لا تتلف التجربة بتناول الحيوانات إى شىء خلاف الغذاء المعد لذلك .

ويجب ملاحظة الآتى فى الطرق الحيوية : –

١) وجود عامل استجابة يمكن قياسة .

٢) أن يكون هذا العامل متخصصاً specific لهذا الفيتامين .

٣) أن يكون هناك مرجع ثابت referance standard للرجوع اليه للمقارنة .

٤) فى حالة وجود الفيتامين فى أكثر من صورة ، يجب معرفة هذه الصور فى المصدر المراد تقدير النشاط فيه .

٥) يجب معرفة ومراعاة عدم حدوث أعراض جماعية multiple deficiency symptoms فى حيوان التجارب .

مميزاتها : –

فى حالة وجود مركبات مشابهة كيميائياً للفيتامين ولكن ليس لها نشاط فيتامينى حيوى ، يمكن التعرف عليها بسهولة (إى تبين كيف يستفيد الحيوان من المادة) . وتستخدم هذه الطرق عادة فى تقدير فيتامينات أ ، د ، هـ .

عيوبها : –

١) مكلفة وتتطلب أموالاً كثيرة سواء لاجراء التجربة (حيوانات كثيرة) أو لانجاز التحاليل المختلفة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢) مجهدة و بطيئة وتحتاج إلى متسع من الوقت .

٣) يجب مقارنتها بالطرق الأخرى .

٤) تحتاج الى حذر شديد جداً حتى لا تتلف التجربة .

هذا ، ويمكن استخدام الحشرات بدلاً من حيوانات التجارب السابق الإشارة إليها ، كما يمكن استعمال تصميم التجارب الحيوية فى دراسة وتقدير مواد أخرى غير الفيتامينات ، مثل تقدير ودراسة المبيدات سواء على الحشرات أو على حيوانات التجارب المعملية .

ثانياً : الطرق الميكروبية Microbiolgical Methods

يختلف أساس تقدير الفيتامينات بهذا النوع من الطرق على حسب عامل الاستجابة وكيفية قياسه . وطرق التقدير بهذه الطرق تنقسم إلى مجموعتين أساسيتين وهما : –

١ – طرق تعتمد على قياس نمو الكائن الحى الدقيق مباشرة growth of microorganism . ومن أمثلة هذه الطرق قياس العكارة measurement of turbidity كمؤشر للنمو، أو قياس وزن الخلايا النامية الجافة dry cells ،أو قياس كمية النيتروجين الخلوى amount of cellular N_2 ، أو تقدير عدد الخلايا مباشرة direct cell counts ، .... إلخ .

٢ – طرق تعتمد على قياس بعض نواتج التمثيل الغذائى some metabolic products للكائن الحى . وهى مبنية على أساس تقدير أحد نواتج التمثيل الغذائى لهذا الميكروب ، مثل تقدير الأحماض acids أو CO_2 ...... إلخ .

وجدول (١٤) يلخص التقديرات الميكروبيولوجية للفيتامينات .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

TYPICAL MICROBIOLOGICAL DETERMINATIONS OF THE VITAMINS

Vitamin	*Extraction and Hydrolytic Procedure*	*Test Microorganisms*	*Vitamin Concentration* at Half Maximum Growth	at Maximum Growth	*Response Measured*
			μg. per 10 ml. tube		
Thiamine	Heat 30 min. 100° C. 0.1 N H_2SO_4 and digest with pepsin and "Taka-Diastase"	*Lactobacillus fermentum* 36 (ATCC 9833)	0.02	0.04	Turbidity
Riboflavin	Autoclave 30 min., 15 lb., 0.1 N HCl	*Lactobacillus casei* (ATCC 7469)	0.06	0.20	Acidity
Niacin	Autoclave 30 min., 15 lb., 1.0 N H_2SO_4	*Lactobacillus arabinosus* 17-5 (ATCC 8014)	0.1	0.4	Acidity
Pantothenic acid	Digest with intestinal phosphatase and liver enzyme	*Lactobacillus arabinosus* 17-5 (ATCC 8014)	0.03	0.20	Acidity
Vitamin B_6	Autoclave 60 min., 20 lb., 0.055 N or 2N H_2SO_4	*Saccharomyces carlsbergensis*	0.01	0.04	Turbidity
Vitamin B_{12}	(1) Aqueous (USP) (2) 15 min., 15 lb., pH 4.5 with fresh $NaHSO_3$	*Lactobacillus leichmanii* 313 (ATCC 7830)	0.00005	0.0002	Acidity
Biotin	Autoclave 60 min., 15 lb., 6 N H_2SO_4	*Lactobacillus arabinosus*	0.0004	0.0015	Acidity
Folic acids	Digest by specific enzymes from chicken pancreas	*Lactobacillus casei* (ATCC 7469)	0.0005	0.005	Acidity
p-Aminobenzoic acid	Autoclave 1 hr., 15 lb. 6 N H_2SO_4	*Neurospora crassa* 1633 (ATCC 9278)	0.015	0.04	Weight
Choline	Autoclave 120 min., 15 lb., 1 N H_2SO_4	Cholineless mutant of *Neurospora crassa* No. 34486 (ATCC 9277)	6*	30*	Weight
Inositol	Reflux 6 hrs., 120° C., 2.7 N HCl	*Saccharomyces carlsbergensis* (ATCC 9080)	3.0	8.0	Turbidity

* Per 25 ml.

جدول (١٤) التقديرات الميكروبيولوجية النموذجية للفيتامينات

والمشكلة الرئيسية فى هذه الطرق هى استخلاص الفيتامين (أو المركب المراد تقديره) أساساً من المادة المراد تقديره فيها بدون تلف أوفساد وفى ظروف معقمة حتى لا يحدث تلوث فى التقدير .

وفيما يلى اختصار لأحدى طرق قياس العكارة : -

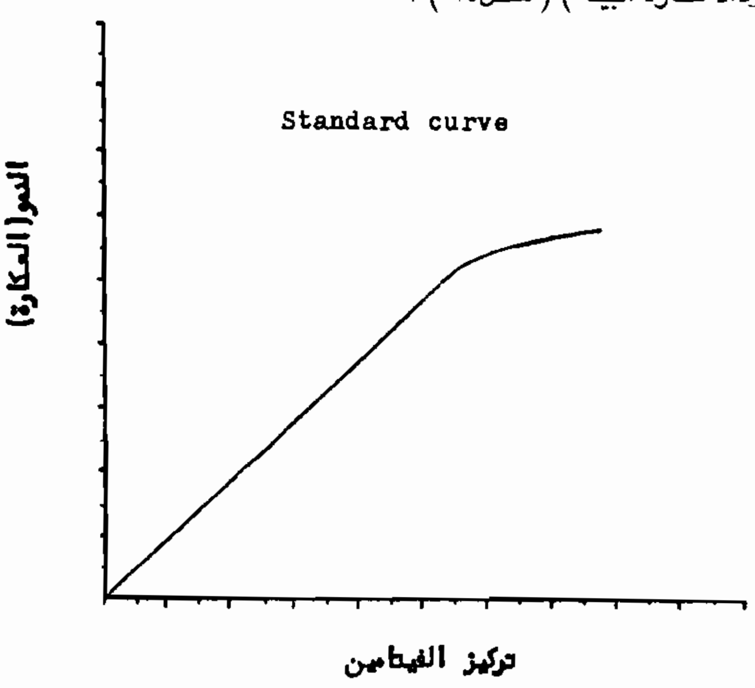
١ - يتم اختيار سلاله الكائن الحى الدقيق المناسبة (بكتريا) والتى لا يمكنها النمو إلا فى وجود هذا الفيتامين ، ويتم تنقيته وغسيله عدة مرات .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ – يتم تحضير تركيزات مختلفة من الفيتامين معلومة بالضبط .

٤ – يحضر حجم معلوم بالضبط من التركيزات المختلفة من الفيتامين فى بيئة النمو المعقمة مع الكائن الحي الدقيق ، وتقاس العكارة فى جهاز الـ spectrophotometer (على طول موجه ٥٨٠ nm) ثم يحضن لفترة زمنيه مناسبة وعلى درجة حرارة مناسبة (عادة ٣٧°م) .

٥ – بعد التحضين تقاس العكارة أيضاً، ثم يرسم المنحنى القياسى لذلك . وهنا يكون عامل الأستجابة هو النمو والمعبر عنه بالعكارة (حيث بزيادة عدد خلايا البكتريا تزداد عكارة البيئة) (شكل١٥) .



شكل (١٥) المنحنى القياسى لعلاقه تركيز الفيتامين بنمو الكائنات الحية الدقيقة .

٦ – ومن ناحية أخرى يتم أستخلاص الفيتامين من العينة المراد تقديره فيها ويحضن فى نفس الظروف فى بيئة خالية منه تماماً وتقاس العكارة أيضاً .

٧ – تقارن عكارة العينة المجهولة مع المنحنى القياس ، ومنها يمكن أيجاد تركيز الفيتامين فى هذه العينة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مميزاتها : -

١) قصر الوقت بالمقارنة بالطرق الحيوية .

٢) كمية الفيتامين التى تستعمل فى التقدير تكون صغيرة جداً بالمقارنة بالطرق الحيوية .

عيوبها : -

أستخلاص المادة (الفيتامين) المراد تقديرها من مصادرها ، وذلك قبل أضافتها إلى بيئة الكائن الحى ، وهذا قد يضر بها ويتلفها .

ومن أمثلة هذه الطرق : -

١) طرق تستعمل بكتريا حمض اللاكتيك Lactic acid bacteria .

٢) طرق تستعمل الخميرة Yeasts .

٣) طرق أخرى تستعمل Neurospora , Miscellaneous Microorganisms .

ثالثاً : الطرق الكيميائية Chemical Methods

الأساس النظرى لهذه الطرق يعتمد أساساً على أجراء تفاعل كيميائى معين مع الفيتامين بأضافة جوهر كشاف مناسب ، حيث ينتج من هذا التفاعل لون يقاس فى أجهزة قياس الألوان colorimeters . ومن شروط هذه الطرق إنه لابد من عدم حدوث تداخل بين تقدير الفيتامين وإى ماده اخرى وأعطاء نفس اللون ، وأن يكون اللون الناتج من تفاعل الجوهر الكشاف مع الفيتامين علاقة كمية مع كمية الفيتامين (تركيز الفيتامين يتناسب طردياً مع α اللون) (إى علاقة خطية) .

مميزاتها : -

تمتاز بسرعة اجرائها وسهولتها بالمقارنة بالطرق السابقة ، وأيضاً عدم تكلفتها بالمقارنة بها .

عيوبها : -

١) لا تقدر هذه الطرق المشابهات المختلفة للفيتامين ولكنها لا تفرق بينها ، وعلى ذلك فهى لا تقدر النشاط الفعلى للفيتامين بعكس الطرق السابقة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢) قد يحدث تداخل بين طبيعة التفاعل بين جوهر الكشاف المستخدم وبين مواد أخرى، وهذا يؤدى إلى حدوث أخطاء كبيرة .

ويدخل تحت هذه الطرق بعض الطرق الأخرى منها : -

أ - الطرق الكيميائية الحيوية Biochemical methods : -

وهى مبنية على أساس تقدير بعض الوظائف الكيميائية الحيوية للفيتامينات والتى تعلب دوراً هاماً فى جسم الكائن الحى ، مثل تقدير فيتامين ب١ عن طريق تقدير نشاط أنزيم Carboxylase والذى يدخل فيه الفيتامين كمعاون أنزيمى .

ب - الطرق الكيميائية الدقيقة Microchemical methcds : -

وهى طرق حديثة تطبق لتقدير بعض الفيتامينات على نطاق واسع ، حيث يستخدم فيها كميات صغيرة من العينة المراد تقدير فيها الفيتامين وكميات صغيرة من الجواهر الكشافة أيضاً .

رابعاً : الطرق الطبيعية Physical Methods

تعتمد هذه الطرق أساساً على وجود مجاميع معينة فى جزىء الفيتامين ، وخواص هذه المجموعات الطبيعية وسلوكها من حيث الفلورة والامتصاصات الضوئية ، أو بمعنى آخر تعتمد على قياس أحد الخواص الطبيعية للفيتامين some physical properties of Vit. مباشرة أو بعد اجراء تفاعل كيميائى معين ، مثل قياس لونه إذا كان ملوناً مثلاً كما فى تقدير Provitamin A (الكاروتين) ، أو قياس الامتصاص الطيفى له بعد الحصول عليه فى صورة نقية .

مميزاتها : -

هذه الطرق من أحدث وأسرع وأدق الطرق المتبعة فى تقدير الفيتامينات وأرخصها أيضاً .

عيوبها : -

حدوث تداخلات أيضاً مع بعض المركبات الأخرى ، وهى لا تقدر الكمية الفعلية النشطة للفيتامين (تقدر المشابهات مع بعضها) . كما أنها تحتاج إلى أجهزة امتصاص دقيقة والتى يحتمل عدم توافرها .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ومن أمثلة هذه الطرق : -

١ - طرق تتضمن قياس الامتصاص فى منطقة الأشعة الفوق بنفسجية UV ، مثل تقدير فيتامين أ وبادئات فيتامين أ provit . A وخلافه .

٢ - طرق تتضمن قياس الفلورة Fluorimetry كما فى تقدير الثيامين والريبوفلافين .

٣ - طرق القياس اللونى Colorimetriy ، كما فى تقدير الكاروتينات .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحليل الفيتامينات Vitamins Analysis

مـقدمــة : -

الفيامينات هى مجموعة مختلفة ومتنوعة من المواد توجد فى الطعام بكميات تتراوح من ميكروجرامات قليلة few micrograms إلى عدة سنتيجرامات centigrams لكل ١٠٠ جم من الغذاء . بعض هذه الفيـتامـينات لهـا صـورة ذو بناء كيـمـيائى واحد ولهـا عـدة مـشـابهـات مختلـفة ، وعليه فإن لها درجات مختلفة فى النشاط الحيوى . فعلى سبيل المثال يتكون فيتامين هـ من ثمان مركبات كل منها ذات نشاط حيوى مختلف عن الآخر ، وفيتامين ب المركب هى مجموعة من المركبات (ثيامين ونياسين وريبوفلافين و B_6 و B_{12} و حمض البانتوثينيك و حمض الفوليك والبيوتين) ولكل واحد منهم له وظائف بيولوجية مختلفة عن الآخر. بالاضافة إلى ذلك ، هناك مركبات عديدة مـثل حمض الأروتيك Orotitc acid وحمـض البـانجاميك Pangamic acid (Vit . B_{15}) والتى يدعى أنها ذات خواص مشابهة للفيتامين Vitamin - like properties ولكن لم يثبت أنها فيتامينات .

وبالنسبة لتحليل وتقدير الفيتامينات لابد أن يؤخذ فى الاعتبار الصورة التى تعرض بها النتـائج ، فكل نتـائج تحليل الأغذية تُعرض عـادة كنسبـة مئـوية ، ولكن بالنسبـة لبـعض الفيتامينات فإن هذا الوضع يختلف قليلاً .

وتسجل الآن نتائج الفيتامينات معتمدة أساساً على الوزن weight basis ، عادة ميكرو جرام µg أو ميللى جرام mg لكل ١٠٠ جم من طعام ، وتلك هى الصورة المقررة والمفضلة . وفى قليل من الأمثلة الأخرى المختلفة ربما من المفيد أكثر تسجيل محتوى الفيتامين بطرق أخرى . فعلى سبيل المثال ، فيتامين هـ فى بعض الأحيان يعبر عنه فـى صـورة ميللى جرام لكل جرام حمض لينوليك mg/g Linoleic acid . حيث أنه مترتبط بالتمثيل الغذائى للدهون. وحيث أن نشاط الفيتامين يستمد derive من عدة مواد مختلفة فى النشـاط الحيوى ، ويلزم للكائن الحى مجموع هذا النشـاط الحيـوى ، وعليـه فـإنه يستـخـدم مفـهـوم concept هـذه المكافئـات. فنشـاط فـيتـامين أ يمكن أن يستـمـد من الريتـينول Retinol ومن الكاروتينيـدات المخـتلفـة ذات النشـاط الحـيـوى Carotenoids خـصـوصـاً البيتـاكـارتين . فمثـلاً مكافىء ميكروجـرام واحــد من الريتينول µg retinol equivalent يعـادل ميكرو جرام واحد من الريتينول أو ٦ ميكروجرام بيتاكاروتين (فى الإنسان) أو ١٢ ميكروجرام من الكاروتينيدات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأخرى ذات النشاط الحيوى ، لذلك فإن النشاط الكلى لفيتامين أ يمكن التعبير عنه كمكافئات ريتنول as retinol equivalents .

أخذ العينة sampling من الأغذية المختلفة هى مشكلة صعبة جداً ، وهذا ليس فقط لأختلاف محتوى الفيتامين بدرجة كبيرة فى المنتجات من مكان لآخر ، ولكن بالأضافة إلى ذلك، كثير من الفيامينات حساسة للضوء أو للاكسجين أو للحرارة أو لفعل الأنزيمات وعلى ذلك فلابد من أن يؤخذ هذا فى الاعتبار عند الحصول على عينه ممثلة لتحليلها . ولابد من التأكد أنها ممثلة تماماً للعينة ككل ، ولابد من وجود ضمان كافى للمحافظة عليها من التلف بوضعها مثلاً فى أوعية أو صناديق containers خاصة ومناسبة ، ويستخدم وسط ثابت (بارد) لنقل العينات الى المعمل بأسرع ما يمكن . والتجفيد freeze- drying هو تكنيك معملى ذات قيمة كبيرة لمعظم الفيتامينات الثابتة والتى لا تتأثر بالعوامل الأخرى . ولكن بالنسبة لفيتامين أ وفيتامين حـ فمن الأحسن لتقديرهما بدقة أن يتم ذلك بسرعة وفى الحال immediatly بمجرد وصولها إلى المعمل بقدر الأمكان . وتعتمد الطرق المستخدمة فى تقدير الفيتامينات فى الأطعمه الطازجة الغير مجهزة (النيئه) raw أو المطبوخة cooked أو المعاملة processed تعتمد على طبيعة الفيتامين ، وعلى تركيزة فى الطعام ، وعلى وجود أو غياب المواد المتداخلة سواء كانت طبيعية أو مضافة added . وأول خطوه فى التحليل هى تحرير release الفيتامين من أى صورة مرتبطة combined ، ويمكن أجراء ذلك بالمعاملة بالأحماض أو بالقلويات أو بالأنزيمات ، ثم أستخلاصة بعد ذلك بمذيب . وبعد أزالة كل المواد المتداخلة بتكنيكات عددة مثل كروماتوجرافى الأعمده أو الطبقة الرقيقة (TLC) ، يمكن تقدير الفيتامين كمياً بتكنيك نهائى مناسب مثل طرق المعايرة titrimetry ، أو طرق القياس اللونى colorimetry ، أوالقياس الطيفى فى منطقة الأشعة الفوق بنفسيجية (UV spectrometry) ، أو التقدير الميكروبيولوجى microbiological assay ، أوقياس الفلورة fluorimetry أو الكروماتوجرافى الغاز – السائل GLC ، أو الكروماتوجرافى السائل تحت ضغط عالى HPLC .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Vitamin A – فيتـــامــين أ

يطلق لفظ فيتامين أ عادة على الريتينول (Vit . A alcohol) وعلى مشابهاته isomers ونظائره analogs ومشتقاته . وهناك نظائر كثيرة لفيتامين أ تضم حمض الريتينويك وأيثير المثيايل و ١٥ – ميثايل الريتينول ، وغيرها من النظائر .... إلخ . وشكل (١٦) يعرض الصيغة البنائية لنظائر فيتامين أ .

Formulas of vitamin A analogs: (a) 13-*cis*-retinoic acid, (b) retinyl methyl ether; (c) 15-dimethylretinol, (d) the trimethylmethoxyphenol analog of ethylretinoate, also termed Ro 10-9359, (e) the ethylamide analog of (d), also termed Ro 11-1430, (f) the dimethylmethoxyethyl-cyclopentenyl analog of retinoic acid, (g) an aryl triene analog of retinoic acid, (h) 2-retinylidene-5, 5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (retinylidene dimedone).

شكل (١٦) الصيغة البنائية لنظائر الريتينول

أما مشتقات الريتينول فهي أكثر وتضم حمض الريتينويك Vit . A acid وفيتامين أ٢ وألدهيد فيتامين أ وغيرها من المشتقات ، وشكل (١٧) يعرض الصيغة البنائية لمشتقات الريتينول وأسم كل منها أشير إليه في جدول (١٥) .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Formulas for retinol and its derivatives. The names of depicted compounds are referred to in Table 17.

شكل (١٧) الصيغة البنائية للريتينول ومشتقاته وأسم كل منها أشير إليه فى جدول (١٥)

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

Recommended term[a]	Synonyms
Retinol (a,b)	Vitamin A_1 alcohol, axerophthol
Retinal, retinaldehyde (c)	Vitamin A_1 aldehyde, retinene
Retinoic acid (d)	Vitamin A_1 acid
3-Dehydroretinol (e)	Vitamin A_2
11-*Cis*-retinaldehyde (f)	11-*Cis* or neo b Vitamin A aldehyde
5,6-Epoxyretinol (g)	5,6-Epoxy vitamin A alcohol
Anhydroretinol (h)	Anhydro vitamin A
4-Ketoretinol (i)	4-Keto vitamin A alcohol
Retinoyl β-glucuronide (j)	Vitamin A acid β-glucuronide
Retinyl phosphate (k)	Vitamin A phosphate
Retinyl palmitate (l)	Vitamin A palmitate
Retinyl acetate	Vitamin A acetate

[a]The formulas of most compounds (a, b, c, . . .) refer to Fig.

جدول (١٥) الريتينول وأسماء مشتقاته والصيغة
البنائية لكل منها تم توضيحها فى شكل (١٧)

تفاعلات فيتامين أ : -

فيتامين أ سريع التلف labile بالحرارة وبالحمض والضوء خصوصاً الأشعة فوق البنفسجية ، فيحدث له inactivation وisomerization . وهو غير ثابت أيضاً للعوامل المؤكسده وتكسيره بفعل أكسجين الهواء الجوى يكون أسرع خصوصاً فى وجود المعادن والبيروكسيدات ، ولكنه ثابت فى الوسط القلوى .

الخواص : -

الوزن الجزيئى MW = ٢٨٦,٤ - درجة الإنصهارMP = ٦٢ - ٦٤° م .

الذوبان : - يذوب فى الكلوروفورم والأيثانول وغير ذائب فى الماء .

الأمتصاص : - أقصى أمتصاص له على طول موجه ٣٢٥ - ٣٢٨ nm .

هيئته : - زيت أصفر Yellow oil .

صورته البللورية : - منشورية Prisms .

صورة : - فى صورة أسترات خلات acetate وباليتات palmitate.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وجدول (١٦) يلخص الخواص الطبيعية للريتينول all trans وإستراته .

Physical Properties of All-*Trans*-Retinol and Its Esters

Property	Retinol	Retinyl acetate	Retinyl palmitate
Formula	$C_{20}H_{30}O$	$C_{22}H_{32}O_2$	$C_{36}H_{60}O_2$
Formula weight	286.46	328.50	524.88
Melting point (°C)	63-64	57-59	28-29
UV Absorption[a]			
λ_{max}	325	326	328
$E^{1\%}_{1cm}$	1820	1530	960
ε	52,140	50,260	50,390
Fluorescence			
Excitation λ_{max}	325	325	325
Emission λ_{max}	470	470	470

[a]In isopropanol. Values are similar in ethanol but differ in chloroform and other solvents. Absorbency values for retinol in hexane, for example, are essentially the same as in isopropanol, but for retinyl esters in hexane are about 3% higher.

جدول (١٦) الخواص الطبيعية للريتينول all trans وإستراته .

أمراض نقص فيتامين أ Deficiency diseases : -

١ – جفاف ملتحمة العين Xeropthalmia .

٢ – تضخم القرنية Hyperkeratosis .

٣ – لين القرنية Keratomalacia .

٤ – Nyctalopia.

٥– Hemeralopia .

٦ – العشى الليلى Night blindess .

ومرض جفاف ملتحمة العين قد يتطور إلى Keratomalacia وتعنى تكوين الكيراتين وخشونة الأغشية الطلائية الدقيقة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أعراض النقص Deficiency symptoms : -

١ - **العشي الليلى** : - وهو عدم القدرة على الإبصار فى الليل خصوصاً عند الإنتقال من وسط مضىء إلى وسط مظلم . والمصاب بهذا العرض أو المرض يكون ذو بصر عادى فى النهار ولكنه يكون ذو بصر ضعيف ليلاً بسبب اختلال عملية الإبصار نفسها لنقص فيتامين أ ، اللهم فى عملية الرؤية فى الضوء الخافت .

٢ - جفاف الجلد والأغشية المخاطية .

٣ - ظهور خطوط مستعرضة فى الأظافر .

٤ - التأخر فى نمو الأطفال وفى الولادة (بالنسبة للحوامل) .

أما أعراض نقصه فى حيوانات المعمل فهى : -

١ - ضعف ورداءة نمو العظام bones والأسنان .

٢ - اعادة امتصاص resorption الجنين fetus وضمور الخلايا الطلائية النامية .

٣ - حصوات بولية Urolithiosis - Urinary calculi .

توزيعه ومصادره Distributon and Sources

١ - وجوده Occurance : -

أ - **فى المصادر النباتية** Plants : - يوجد فى صورة بادئات فيتامين أ provitamins أى على صورة كاروتينيدات corotenoids . ومن أهم مصادره فى الفواكه المشمش والشمام yellow melons والخوخ والبرقوق . أما فى الخضروات فيوجد فى نفس الصورة أيضاً فى الجزر carrots والخس والكرنب والنعناع والبقدونس والقرع والسبانخ والبطاطا الصفراء . ويوجد فى النقل nuts خصوصاً فى البندق وفى بعض النقل الاخرى بكميات بسيطة .

ب - **فى المصادر الحيوانية** Animals : يوجد فيتامين أ فى كل الفقاريات vertabrates ، والكاروتينيدات توجد فى بعض اللافقاريات (القشريات مثل الجمبرى) خصوصاً فيتامين أ٢ . كما توجد فى Fresh - water fish .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مكان وجوده فى الحيوان Location : - فى الكبد liver ، والقلب heart ، والرئة lungs ، والدهون fats ، و adrenals . الشبكية retina ، و الكلى kidney ، واللبن milk ، وبلازما الدم blood plasma ، وفى البيض eggs .

ويوجد الفيتامين فى المصادر الحيوانية على شكله الأصلى فى صورة إسترية كما فى زيت كبد الحوت cod liver oil .

وتوجد الكاروتينيدات فى عديد من الحيوانات على حسب نوع غذائها (كما فى لبن ودهن البقر) . وبالنسبة لكاروتينيدات بيض الدجاج hen's egg فهى أساساً Xanthophyll ، وهو مشابه غير نشط حيوياً .

حـ - فى الكائنات الحية الدقيقة M.O. : - توجد الكاروتينات فى الطحالب algae ، وفى الفطريات fungi ، وفى البكتريا bacteria ، وهى تقوم بتخليقها . أما البكتريا المعوية فلا يمكنها تخليق فيتامين أ .

٢ - المصادر الغذائية Dietary Sources :-

أ - المصادر العالية High : من ١٠٠٠٠ إلى ٦٧٠٠٠ وحدة دولية IU لكل ١٠٠ جم وهى تشمل ما يلى : -

١- كبد (بقر beef ، خنزير pig ، خراف sheep ، عجول calf ، دجاج chicken) .

٢- زيت كبد liver oil (حوت cod ،سالمون salmon ، قرش shark وفى sperm whale) .

٣ - جزر ونعناع وبقدونس وسبانخ وزيت النخيل palm oil .

ب - المصادر المتوسطة Medium : - من ١٠٠٠٠ الى ١٠٠٠ وحدة دولية IU لكل ١٠٠ جم وهى تشمل ما يلى : -

١- زبد butter ، جبن cheese ، صفاربيض egg yolk ، مارجرين margarine ، لبن جاف dried milk ، كريمة cream ، white fish ، ell (نوع من السمك) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ – **الكلاوى** kidneys (بقر ، خنزير ، غنم) ولحم الخنزير pork .

٣ – **فواكة** : – مانجو . بطيخ أصفر . خوخ ، مشمش .

٤ – خضروات :– مانجو ، شمام ، بطاطا ، طماطم ، كرنب kale ، خس أفرنجي ، الكرات leek ، شكوريا chicory .

حـ – المصادر القليلة (المنخفضة) Low :– من ١٠٠ إلى ١٠٠٠وحدة دولية IU لكل١٠٠ جم وهى تشمل مايلى :–

١– لبن milk

٢ – اسماك : – رنجة harring ، سالمون salmon ، السبوط carp سردين sardines ، المحار oyster .

٣ – فواكه : – أعناب graps ، موز bananas ، التوت berry بأنواعه (أسود – أزرق ..... إلخ)، برتقال ، تفاح ، راوند rhubarb (عشب) ، زيتون ، اليوسفى tangerine ، عنب أحمر red currants .

٤ – خضر : – قرع صيفى summer squash ، اسبارجس asparagus ، بقوليات beans (ماعدا الفاصوايا) ، كرنب ملفوف cabbage ، حمص peas ، ذرة corn ، بامية ، فول سودانى peanuts ، pea pecans جوز أسود black walnuts ، بندق hazelnuts .

الدور الغذائى والطبى Medical and Nutritional Role

١) وحدات فيتامين أ Units :–

كان ومايزال حتى اليوم يعبر عن نشاط فيتامين أ بالوحدات الدولية ، ولكن منذ سنة ١٩٦٧ عبر عن القيمة البيولوجية لنشاط مستحضرات فيتامين أ النشطة خصوصاً فى الأغذية عبر عنها بمكافئات الريتينول retinol equivalents (µg) ، فواحد ميكرجرام بيتاكاروتين فى الغذاء يكافىء ٠,١٦٧ ميكروجرام ريتنيول ، وواحد ميكرجرام من البروفيتامين أ الأخرى تكافىء ٠,٠٨٤ ميكروجرام ريتينول ، وعلى ذلك فمكافئات الريتينول الكليه تحسب من المعادلة التالية :

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Retinol equivalents (μg) =

(Retinol × 1.000) + (β- Carotene × 0.167) + (Oher Provitamin A × 0.084) .

ويمكن تطبيق التحويلات التالية : -

1 Retinol equivalent = 1 μg Retinol

= 6 μg β- Carotene

= 12 μg other provit . A carotenoids

= 3.33 IU Retinol

1 IU Vit . A = 0.344 μg Retinyl acetae

= 0.3 μg Retinol

= 0.535 μg Retinyl palmitate

مع مراعاة إن الريتينول فى هذه الحالات كلها all - trans . والتقييم السابق للكاروتينات يعتمد على الخبرة experience فى إن هذه البروفيتامينات فى الأغذية المختلفة تمتص بدرجات فاعلية مختلفة ولا تتحول بالكامل الى فيتامين أ .

ومما هو جدير بالذكر إن المعادلة الأولى أستنتجت من حقيقة النشاط الحيوى للبيتاكاروتين ، فهو له ١/٦ النشاط الحيوى للريتينول . أما الألفاكاروتين والكربتوزانثين فلهما ١/١٢ من النشاط الحيوى للريتينول . وجدول (١٧) يوضح الوحدات الدولية ومكافئات الريتينول للإنسان .

International Units (IU) and Retinol Equivalents for Humans

Compound	μg/IU	IU/g	Retinol equivalents/μg
All-*trans* retinol	0.300	3.33×10^6	1.000
All-*trans* retinyl acetate	0.344	2.91×10^6	-
All-*trans* retinyl palmitate	0.549	1.82×10^6	-
All-*trans* β-carotene	1.8[a]	0.56×10^6	0.167
Mixed carotenoids	3.6	0.28×10^6	0.083

جدول (١٧) الوحدات الدولية (IU) ومكافئات الريتينول

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢) مستويات الدم الطبيعي Normal Blood Levels : -

من ١٠٠ – ٣٠٠ وحده دولية / ١٠٠ مل سيرم .

٣) الكميات الموصى بها فى الغذاء Recommended Allowance :-

للأطفال Children : – ٢٠٠٠ – ٣٥٠٠ وحده دولية / يوم .

للبالغين Adults : – ٥٠٠٠ وحده دولية / يوم .

الحالات الخاصة :-

الحامل Pregnancy : – ٦٠٠٠ وحده دولية / يوم .

الرضاعة Lactation : – ٨٠٠٠ وحده دولية / يوم .

٤) كيفية تناوله او الأعطاء Administration : -

الطريقة المفضلة لاعطاء فيتامين أ هى عن طريق الفم Oral . ولم يجرب الطريق الموضعى topical ، ولا يعطى عن طريق الحقن ingection .

٥) تأثيرات الجرعة العالية Effect of overdose : -

عند تناول جرعات عالية من الفيتامين يحدث بعض أو كل الأعراض التالية : –

١ – ١٠٠٠٠٠ وحده دولية / يوم عادة ما تكون سامه toxic للإنسان .

٢ – حساسيه مفرطة irritability وأضرار عصبية Nerve lesions .

٣ – Exophthalmia .

٤ – تكوين خلايا ميكوزية mucosa cells ذات جدر متكرتنة keratinized .

٥ – تعب fatigue ، وأرق insomnia وألم فى العظام والمفاصل painful bones and joints .

٦ – نمو عظام غير طبيعي abnormal bone growth .

٧ – فقد الشعر loss of hair ، و يرقان jaundice ، وحك فى الجلد itchy skin .

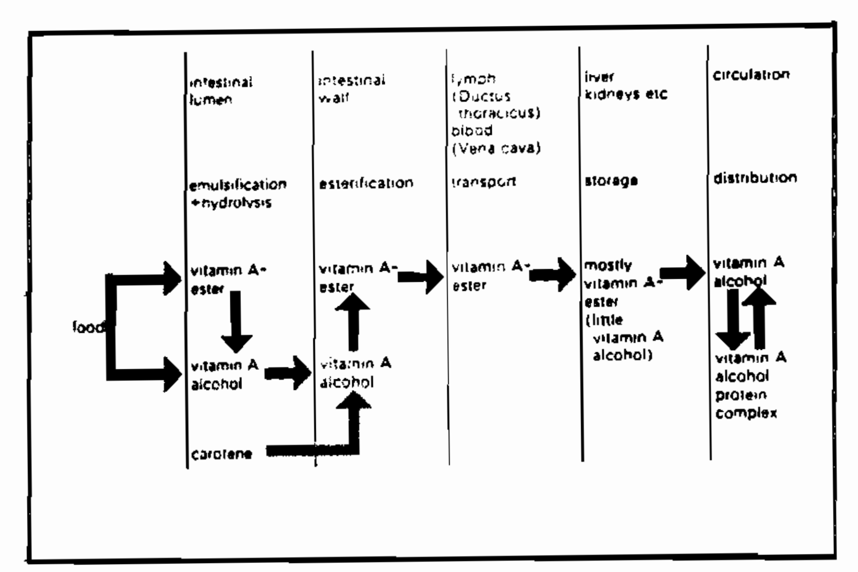
٨ – قصر الوقت اللازم للتجلط decreased clotting time .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٩ – ارتفاع نشاط أنزيم الفوسفاتير elevated serum alkaline phosphatase

التمثيل الغذائى لفيتامين أ :-

يبدأ التمثيل الغذائى لفيتامين أ فى الجهاز العصبى ، فعندما يتناول الإنسان فيتامين أ أو استراته أو بادئاته مع الغذاء ، يتم أولا تحويلها الى مستحلبات دهنية فى داخل تجويف القناه المعوية حتى يسهل تحليلها مائياً وأمتصاصها . أسترات فيتامين أ تتحلل مائياً الى فيتامين أ حر يمتص بواسطة خلايا ميكوزا الأمعاء الدقيقة ، كما على جدراها أيضاً يحدث تحول الكاوتينات إلى فيتامين أ . وبعد ذلك يؤستر فيتامين أ لينتقل الى الكبد عن طريق الجهاز الليمفاوى والأوعية الدموية . ويخزن فيتامين أ فى الكبد والكلى وغيرها من الأنسجة فى صورة استر وقليل منه فى صورة كحولية ، ومن الكبد يتم توزيعة إلى أعضاء الجسم المختلفة . وشكل (١٨) يوضح امتصاص وتخزين ونقل فيتامين أ فى الجسم . والجانب الآخر من التمثيل الغذائى ، هو الاستفادة منه فى الخلايا وتكسيره وهدمه ، ففى الكبد تبدأ هذه الرحلة حيث تتحلل استرات الريتينيل بفعل أنزيمات الأستريز esterases الى ريتينول حر والذى يرتبط مع بروتين خاص وينتقل إلى الخلايا الهدف (الخلايا التى تحتاج إليه) ومنها خلايا العين ، حيث يتحول بفعل أنزيمات الـ dehydrgenase الى ريتينال retinal ، أما فى الخلايا الأخرى فيتحول إلى حمض ريتينويك retinoic acid . وبعد أن يقوم بدوره ، يتحول الى صورة

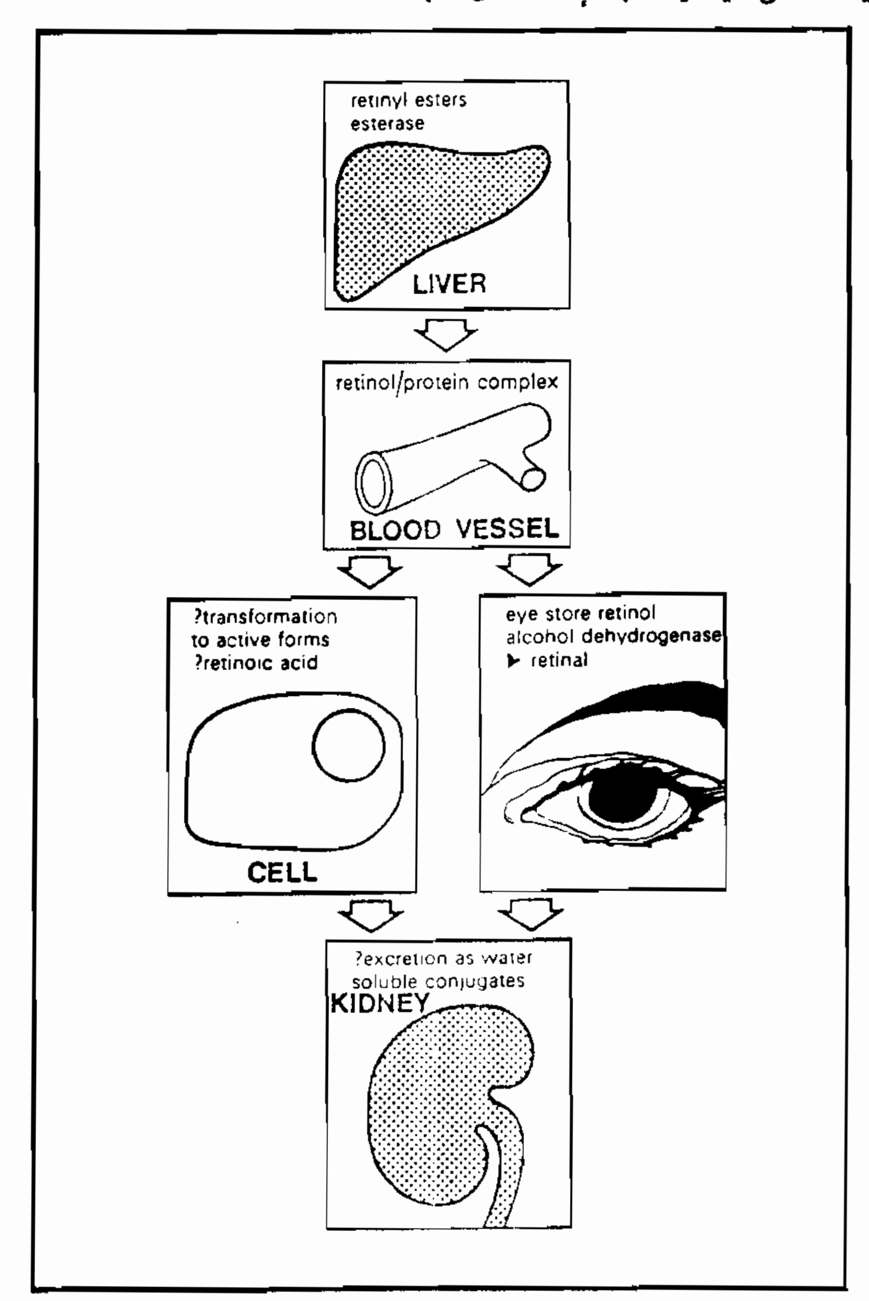


Schematic representation of absorption, storage and transport of vitamin A.

شكل (١٨) صورة تمثيلية لامتصاص وتخزين ونقل فيتامين أ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مرتبطة conjugates ذائبة فى الماء ويفرز مع البول عن طريقة الكلية . وشكل (١٩) يلخص **التمثيل الغذائى لفيتامين أ بعد إنطلاقه من الكبد .**



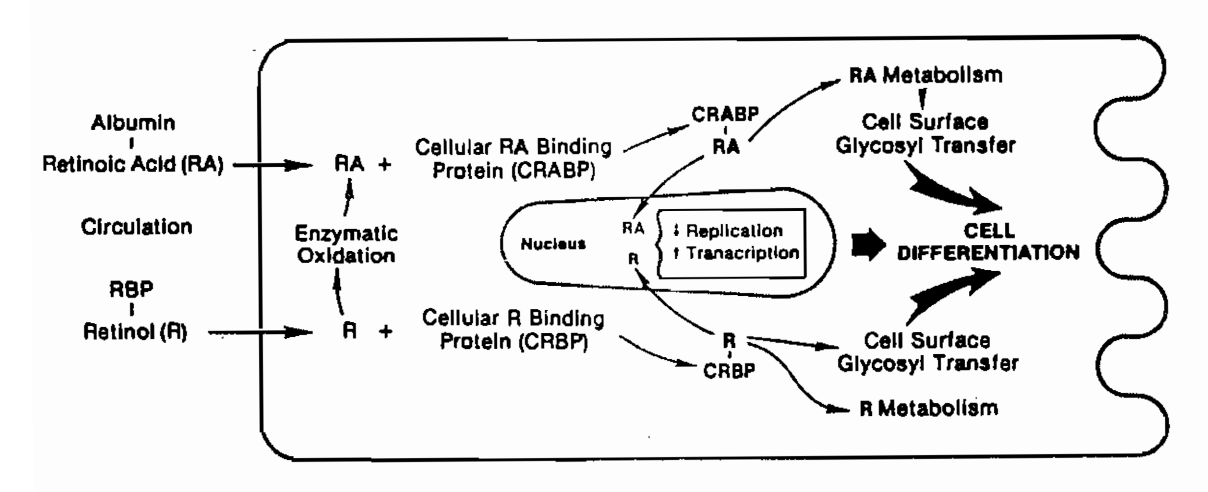
Metabolism of vitamin A after release from the liver.

شكل (١٩) ملخص للتمثيل الغذائى لڤيتامين أ بعد انطلاقه من الكبد

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أما فى الخلايا الطلائية فإنه يلعب دوراً رئيسياً فى تميزها differentiatian ، فبعد أن ينتقل حمض الريتينويك (RA) المحمول مع الألبيومين إلى سطح الخلايا الطلائيه فأنه يدخل فيها ويرتبط مع بروتين خاص يسمى Celluler Retinoic Acid Binding Protein (CRABP) ، أما الريتينول (R) فينتقل أيضاً الى الخلايا الطلائية خلال بروتين خاص يسمى Retinol Binding Protin (RBP) وداخل الخلية يرتبط مع بروتين آخر ولكنه خلوى Cellular Retinol Binding Protein أو يتحول الى RA . وكل من R وRA يدخلا النواه ويؤثرا على عمليتى النسخ replication والترجمة transcription وتلك بدورها تقوم بعملية تميز الخلية. وشكل (٢٠) يلخص الميكانيكية المحتمله لفعل فيتامين أ فى الخلايا الطلائيه .

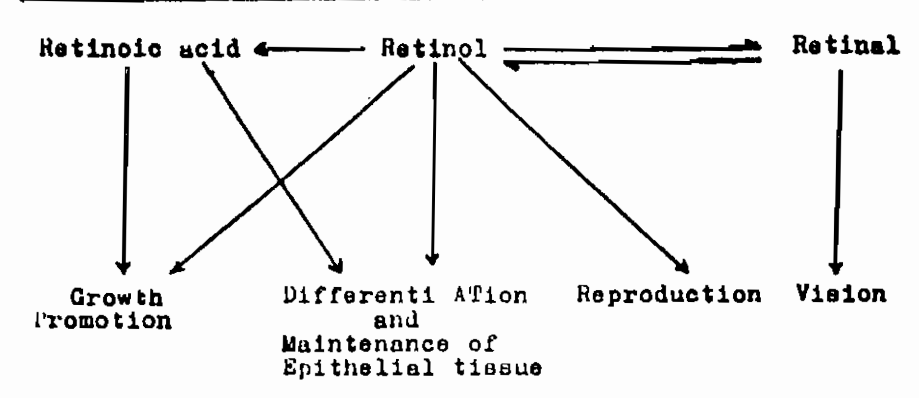
Proposed mechanism of action of Vitamin A on an epithelial cell



شكل (٢٠) الميكانيكة المقترحة لفعل فيتامين أ فى الخلايا الطلائية .

ومما هو جدير بالذكر أن الصور المختلفة للريتينول على صلة ببعضها ، ومن خلال هذه الصور يكون الفعل البيولوجى لفيتامين أ . فيتحول الريتينول الى RA (غير عكسى) وهذا يلعب دوراً هاماً فى نمو الإنسان والحيوان growth promotion ، وفى تميز الأنسجة الطلائيه والعناية بها . والريتينول نفسه يشارك بدوره فى هذه العمليات ويضاف إليها أنه لازم لعملية التكاثر reprodution . والريتينول يتحول أيضاً إلى ريتينال (فى العين) وهذا بدوره يلزم للرؤية vision . وشكل (٢١) يلخص الفعل البيولوجى لفيتامين أ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (٢١) الفعل البيولوجى لفيتامين أ

تحليل فيتامين أ

أثناء استخلاص فيتامين أ ، لابد أن تُأخذ عديد من الاحتياطات precaution حتى لا يفقد بعض منه ، فلابد من تلافى avoid ضوء الشمس sunlight المباشر والظروف الحامضية . وأثناء التحليل المائى القلوى لابد من وجود مواد مانعة للأكسدة antioxidants . ولابد أيضاً من استعمال المحاليل القياسية للريتينول أو أستراته بسرعة قدر الأمكان بعد تحضيرها . وعند تخزين الريتينول المتبللور crystalline أو مشتقاته لابد من تخزينها تحت غاز النيتروجين أو تحت تفريغ vacuum.

أ - الأستخلاص Exraction : -

الطريقة المتبعة أساساً لاستخلاص فيتامين أ من الأطعمة هى التصبن saponification المتبوع بأستخلاص المواد الغير متصبنة unsaponifiable matter (unsap.) بمذيب مناسب . وعادة ما تسخن العينة الغذائية فى وجود مكثف عاكس مع أيدروكسيد بوتاسيوم كحولى ethanolic KOH لمدة ٢٠ - ٣٠ ق فى وجود مادة مانعة للأكسدة مثل حمض الأسكوربيك أو تحت نيتروجين. ويمكن استخلاص المواد الغير متصبنة بعديد من المذيبات العضوية مثل diethyl ether, hexane, cyclohexane . وحتى يكون الاستخلاص فعال efficient ، يجب أن يحتوى طور الايثانول المائى aqueous ethanolic phase على أقل من ٤٠٪ ماء ، وهذا يرجع لأن الريتينول ينوب نسبياً فى مخاليط الايثانول ٨٠٪ - الماء ٢٠ ٪ . وقد دلت التقارير الحديثة على أنه لو استعمل dimethylsulphoxide

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كمذيب للتصبن فانه يمكن تقليل درجة حرارة وزمن التصبن وهذا بدوره يقلل أحتمالية فقد فيتامين أ بالأكسده oxidation . وفى هذه الطريقة يتم عمل reflex (تسخين فى وجود مكثف عاكس) للعينة بمخلوط من dimethylsulphoxide و ٣٠ ٪ أيدروكسيد صوديوم مائى تحت غاز النتيروجين لمدة ١٥ ق ، ثم يضاف بعد ذلك الماء وتستخلص المواد الغير متصبنة كما هو متبع سابقاً . أثناء عملية التصبن تتحول أسترات الريتنيل retinyl ester إلى ريتينول .

ولو كان محتوى الاسترات فى الطعام كبير ويلزم له استخلاص أكثر فلابد من أستعمال المذيب مباشرة على العينه الغذائية . ففى طريقة أستخلاص فيتامين أ من الكبد يستعمل مخلوط من الأسيتون acetone و light petroleum (أيثيربترولى) بنسبة ١ : ١ يحتوى على ألفا - توكوفيرول كمادة مانعة للأكسدة . ويتم تجهيز الكبد بالطحن grinding مع سيليكاجيل Silica gel و التى تساعد على كل من الطحن ونزع الماء dehydrating agent . وقد بينت تجارب الاسترجاع recovery experiments أن السيليكاجيل لم تحتفظ بأى نشاط لفيتامين أ بالادمصاص adsorption . فطحن العينات مع السيليكاجيل قد أستخدم لاستخلاص الفيتامين من المواد النباتية ، وأنه من الممكن استخدام هذا التكنيك للأطعمة الجافة dry والنصف رطبه semi- moist الأخرى .

ب - الفصل والقياس Separation and Measurment : -

ويضم هذا الجزء خمس طرق (تكنيكات) طبيعية كيميائية Physico - chemical لقياس فيتامين أ ، وفيها لابد من اجراء فصل كروماتوجرافى أولى حتى يتسنى قياس الريتينول ومشتقاته قدر الامكان .

١ - القياس اللونى Colorimetry : -

يتكون لون أزرق كثيف intense blue (λ max 610 nm) عندما يتفاعل الريتينول مع حمض لويس Lewis acid ، ومازالت تستخدم كطريقة شائعة ومألوفة لتقدير الريتينول . فمنذ اكتشاف التفاعل اللونى لفيتامين أ مع ثالث كلوريد الأنتيمون فى الكلوروفورم antimony trichloride ($SbCl_3$) فى سنة ١٩٢٦ مازال يستخدم بكثرة كحامض لويس . وفى مقارنة حديثة لثلاث جواهر لحمض لويس وهم $SbCl_3$ ، وثلاثى فلورو حمض الخليك trifluoroacetic acid (TFA) ، وثلاثى كلورو حمض الخليك trichloroacetic acid (TCA) فى مذيبات كلورونية متنوعة chlorinated solvents ، دلت هذه المقارنة على أن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

TFA فى dichloromethane هو الأفضل والذى يوصى باستعماله عن الجواهر المختبرة الأخرى . وهناك عائق أو عيب للتفاعل اللونى السابق وهو طبيعة اللون الأزرق المتكون والذى يزول بسرعة ، لذلك فلابد وأن يجرى قياس اللون خلال ١٠ - ٣٠ ثانية من اضافة حمض لويس . وهذا يؤدى بدوره الى الافتقار للدقة ، هذا بالاضافة إلى الطبيعة السامة toxic والكاوية والحارقة corrosive لهذه الجواهر .

وترتبط الصعوبات فى هذه الطرق بقياس اللون الأزرق سريع الزوال ، ويمكن التغلب عليها باستعمال activated 1,3-dichloro 2- propanol (dichlorohydrin) كجوهر تلوين color reagent . وهذا الجوهر يعطى لون وردى خفيف pink color يقاس على λ max 555 nm والذى يكون ثابت لمدة ٢ - ١٠ ق . ولكن التفاعل غير شائع استعماله لأن الصعوبات ترتبط بتنشيط جوهر dichlorohydrin ، وبالرغم من اللون الأزرق المتكون مع $SbCl_3$ ومع غيره يزول بسرعة إلا أنه ذو ميزة حسنة لأنه أكثر كثافة more intense عن اللون الوردى الناتج بواسطة 1,3- dichloro 2- propanol وأيضاً أكثر حساسية more sensitive بحوالى مرتين ونصف عن القياس الطيفى فى الـ UV فى التقدير الكمى للريتينول . وتستخدم احماض لويس لتقدير الريتينول كمياً وهى أيضاً تكون نواتج ملونة مع الكاروتينيدات والأستيرولات sterols والمركبات التى على صلة بها (المشابهه لها) related compounds مثل فيامين د . وعلى ذلك فلابد من التخلص من هذه المركبات قبل تقدير الريتينول لمنع التداخل عند التقدير .

مازال يستعمل كروماتوجرافى الأدمصاص adsorption chromatography بكثرة لتنقيه المستخلصات قبل القياس اللونى . وعاده ما تستعمل الألومينا المتعادلة neutral alumina الغير منشطة بالماء deactivated with H_2O (٢ - ١٠٪ مـــاء) . والطريقة الرسمية (AOAC) لتقديره فى الأغذيه توصى بأستخدام ألومينا متعادلة غير نشطة بماء ٥٪ ، ويتم الأحلال elution بـ ١٥ ٪ أسيتون فى هكسان . والطريقة الخاصة بالمارجرين margarine تستعمل عمود سندوتش sandwich columm لألومينا متعادلة وقلوية غير نشطة بماء ٣ ٪ . ويمكن تتبع تحرك الريتينول ومشتقاته على الأعمده الكروماتوجرافية بملاحظة فلورتها fluorecence بأستعمال لمبة UV ذات قوه ضعيفة low power UV lamp . فلو طلب تقدير تركيز أسترات الريتينيل والمشتقات الاخرى منفرده ، فانه يجب فصلها قبل القياس

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

اللونى حيث أن الريتينول ومشابهاته ومشتقاته كلها تتفاعل بنفس الطريقة مع أحماض لويس . ويمكن استعمال ورق مشرب بكربونات زنك Zinc carbonate - impregnated paper مع أسيتون : أيثير بترولى بنسبة ١: ٩٩ يحتوى على ألفا - توكوفيرول كمادة مانعة للأكسدة لفصل أسترات الريتينيل عن الريتينول فى مستخلصات الكبد . ويمكن استعمال أعمدة حمض السيليسيك Silicic acid لفصل الريتنول عن مشتقاته ، وأيضا لفصل عديد من المشابهات الهندسية geometric isomers للريتينول . والعائق الرئيسى عند استعمال كروماتوجرافى الإدمصاص لفصل الريتينول ومشتقاته هو انخفاض كمية الفيتامين المتحصل عليها حيث يسترد بكميات ضئيلة ، لكن يكون الفقد أقل ما يمكن لو أستعملت مضادات أكسدة فى المذيبات المحلة eluting solvents ، وأيضاً إذا كان الوقت المستخدم لفصل الريتينول فى الأعمده أقل ما يمكن قدر الإمكان .

ويسمى تفاعل كلوريد الانتيمون فى الكلوروفورم (فى ظروف خالية من الرطوبة نهائياً) بتفاعل كار- بريس Carr-price reation . وقد لوحظ أن هذا الجوهر من أحسن الأملاح فى ذلك وهذا لمميزات معينة .

مميزات التفاعل اللونى مع أحماض لويس هى :-

١ - اللون الأزرق الناتج من التفاعل ليس حاداً (لون فاتح) وهذا يسهل التقدير ، حيث أن كثافة اللون تتناسب طردياً مع التركيز .

٢ - يمكن التخلص من أى رطوبة فى الوسط بإضافة أندريد حمض خليك .

ولكن من أهم عيوب التفاعل اللونى مع أحماض لويس هى : -

١ - لابد أن يكون حمض لويس المستخدم نقياً تماماً pure وجافاً تماماً dry ، حيث أنه إذا وجدت أى أثار للرطوبة لم يتم التخلص منها تعطى راسب أبيض من تفاعل $SbCl_3$ مع الماء (لذلك يضاف أندريد خليك) . كما يجب استعمال كل الأدوات والمذيبات خالية من الرطوبة وجافة تماماً .

٢ - اللون الناتج من التفاعل سرعان مايزول ويلزم له وقت قصير لقياسه بمجرد خلط المحاليل مع بعضها .

٣ - صعوبة غسيل الأدوات بعد التقدير لتكون رواسب بيضاء فى الأدوات المستعملة من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تفاعل $SbCl_3$ مع الماء ، ويمكن التغلب عليها بالغسيل بحمض HCl مركز .

٤ – بعض المركبات عديدة الروابط الزوجية polyenes مثل الكاروتينيدات تتفاعل أيضاً، مع أن معدل ظهور وطبيعة الناتج الملون مختلفين .

٥ – بعض المركبات الموجود فى البلازما والتى تتكون أثناء تخزينها فى حالة مثلجة (مجمدة بالبرودة frozen) تعطى نتيجة موجبة مع أحماض لويس ، لذلك فإن عينات البلازما المخزنة بهذه الطريقة غالباً ماتعطى قراءات أكبر من الواقع .

٢ – القياس الطيفى فى منطقة الأشعة فوق البنفسجيه : –

وهذه طريقة بسيطة simple لقياس فيتامين أ ، و لكن لها مشكلة (عائق) واحدة رئيسية وهى إن الريتينول ومشتقاته تمتص absorb على موجات ضوئية قريبة من ٣٢٥ nm وهى منطقة من الطيف كثير من المركبات الأخرى تمتص عندها أيضاً . وفى السنوات الأخيرة حدثت تطورات هامه فى الفصل الكروماتوجرافى للريتينول عن المواد المتداخلة جعلت استعمال القياس الطيفى فى الـ UV لتقدير الريتينول ومشتقاته طريقة سهلة وميسرة ورخيصه ودقيقة وكثيرة الاستعمال .

النظام النافع جداً فى تنقية المستخلصات قبل التقدير الكمى للريتينول بالقياس الطيفى فى الـ UV هو الأستفادة من التوزيع partition بين الطور الثابت (الساكن) stationary phase (٩٠٪ ايثانول : ١٠٪ ماء) وبين 2,2,4- trimethylpentane كطور متحرك mobile phase ، حيث يُحمل support الطور الثابت على نوع معين من السيفادكس وهو Sephadex LH-20 .

وقد طبق التوزيع بنجاح على أعمدة سيفادكس LH-20 (٢٥ سم × ٢) سم لتقدير الريتينول كمياً فى مدى واسع من الأغذية المختلفة ، ولو أنه وجد إن مستخلصات فضلات الذبيحة offal والسمك الدهنى fatty fish تتطلب فصل اضافى قبل تقدير الريتينول بالأمتصاص فى الـUV لهذين النوعين من الأغذية . الأجزاء المحتوية على الريتينول فى أعمدة التوزيع يتم تنقيتها مرة أخرى اضافية على عمود (١٥ سم) من Calcium hydrogen phosphate ويتم احلال elute الريتينول بايثير ١٠٪ فى هكسان . وتستخدم أعمدة Calcium hydrogen phosphate آصلاً لتقدير فيتامين هـ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

استخدم أيضاً كروماتوجرافى الجيل gel chromatography على Sephadex LH - 20 فى فصل الريتينول من المارجرين وكبد الخنزير . وقد أستعملت الأبعاد ٦٠سم × ٢,٥ سم لهذه الأعمدة مع الكلوروفورم كعامل مُحل eluting agent . ويمكن لهذا النظام فصل الريتينول عن بالميتات الريتينيل retinyl palmitate أوخلات الريتينيل ، ولكن لا يمكن لهذا النظام فصل بالميتات الريتينيل عن خلات الريتينيل . ولو بدل مذيب الإحلال بمخلوط مكون من كلوروفورم : ايثير بترولى : ميثانول = ٦٥ : ٣٥ : ١ يمكن فصل الريتينول عن الريتينال retinal وحمض الريتينويك retinoic acid . وأعمدة (٥٥سم × ١,١ سم) من Hydroxy - alkoxy propyl sephadex (متاح تحت أسم Lipidex) مع نظام مذيب إيثير بترولى : أسيتون = ٩٢ : ٨ يمكنها فصل بالميتات الريتينيل عن خلات الريتينيل .

٣ - القياس الطيفى بالفلورة Fluorescence Spectrophotometry : -

فلورة الريتينول تكون قوية جداً على طول موجه ٤٨٠ nm مع حث excitation على طول موجة ٣٣٠ - ٣٦٠ nm . وقياسات الفلورة هذه تعتبر طريقة نافعة جداً لتقدير الريتينول كمياً ، لكن أخيراً بينت نتائج بعض الدراسات أن الـ Phytofluene كان المصدر الرئيسى للتداخل بين المشتقات . وميزة القياس بالفلورة fluorimetry هى أن تقدير الريتينول لا يتأثر باى مركب مثل الاستيرولات sterols ، وفيتامين د ، ومستويات منخفضة من الكاروتينيدات ، حيث أن هذه المواد تتداخل بدرجة كبيرة مع التقديرات بالقياس اللونى وكذلك بالـ UV . وفلورة الريتينول تعطى علاقة خطية linear function مع التركيز حتى أن الامتصاص ذاته يصبح معنوياً عند تركيزات تبلغ ٠,٢٥ µg لكل مل . وهناك طرق سريعة لتقدير الريتينول فى اللبن ومنتجاته dairy products ، وهذه الطرق تتضمن تصبن واستخلاص ولا تتضمن كروماتوجرافى . كما بينت الدراسات أن الفلورة بالـ UV ترجع كلية إلى الريتينول ولكن قد يحدث تداخل غير معنوى من Phytofluene لذا يلزم لهذه الطريقة بعض التعديل نتييجة لتداخل هذا المركب .

وبالنسبة للأغذية التى تحتوى على كميات كبيرة من الكاروتينيدات لابد من تنقيتها كروماتوجرافياً قبل استعمالها فى القياس بالفلورة .

ولابد أن تكون المذيبات المستعملة ذات نقاوة عالية high purity ، كما يجب تجنب تعرض الريتينول القياسى للأشعة فوق البنفسجية UV لأن تشعيعة سوف يؤدى إلى تكوين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مشتقات fluorescent retro - Vit .A والتى قد تتداخل مع التقدير . ويتوافر حالياً كواشف فلورونية fluorescence detectors لأنظمة الـ HPLC حتى يتسنى تقدير الريتينول فى الغذاء بطريقة سريعة وحساسة .

٤- الكروماتوجرافى الغازى Gas Chromatography (GC) : -

يتكسر الريتينول وأستراته على درجات الحرارة اللازمة لتطايرة فى الكروماتوجرافى الغـازى ، ولكن أيثـيـرات الريتـينول ثابتـة ، وعلى ذلك يمكن تقـدير الريتـينول كـمـياً بالكروماتوجرافى الغازى لو تحول الريتينول الى ايثيرات ثلاثى ميثايل السيليل trimethyl silyl ethers . ويمكن استعمال N, O- Bis - (trimethylsilyl)- acetamide لتكوين هذه الأيثرات حيث يتم التفاعل خلال دقائق قليله وعلى درجة حرارة الغرفة . كما تستخدم أعمدة الكروماتوجرافى المحتوية على طور ثابت مناسب ، وعاده ما يتم الفصل على ١٧٠ - ١٧٥° م وهذه الأعمدة يمكنها فصل مشابهات الريتينول عن بعضها البعض . أما صعوبة التقدير الكروماتوجرافى الغازى ، حتى تعطى نتائج موثوق فيها ، هى سبق تهيئه preconditioning تعبئة العمود . والطريق البديل لذلك هو أجراء هدرجة الريتينول hydrogenate retinol وأستراته إلى كحول مشبع واسترات ، وتلك ثابتة حرارياً thermally stable وعليه يمكن فصلها بالكروماتوجرافى الغازى . هذا وقد أستخدام تكنيك الـ GC بنجاح فى تحليل الريتينول فى المستحضرات الصيدلانية Pharmaceutical preparations .

٥ - الكروماتوجرافى السائل تحت ضغط عالى HPLC : -

استخدام هذا التكنيك أيضاً فى تقدير فيتامين أ فى الأغذية على نطاق واسع واكثر من أى فيتامين أخر . وهذا التكنيك أستخدام فى الفصل والتقدير السريعين للريتينول ومشابهاته وأستراته ومشتقاته الأخرى .

أمكن فصل الريتينول عن خلات الريتينيل عن فيتامين « هـ » و فيتامين « د » بهذا التكنيك بأعمده خاصة بمساهمه مذيب مناسب (ميثانول - ماء متدرج) ، حيث طبق هذا التكنيك على أنواع مختلفة من الأغذية (مارجرين، أغذية أطفال.... الخ)، والخطوة الأولى هى أجراء عملية التصبن للعينة ثم أستخلاص من المواد الغير متصبه بالهكسان ويحقن المستخلص مباشرة فى جهاز الـ HPLC ، ويتم الكشف عن الريتينول بقياس الأمتصاص على طول موجه ٢٥٤ nm ، حيث يزود الجهاز بكواشف خاصة فى منطقة الـ UV ذات مرشحات filters

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢٥٤ nm وتلك قادرة على كشف detect أقل من ١٠ ng ريتينول .

ولو تضمن جهاز الـ HPLC عمود gel permeation (ترشيح خلال الجيل) فإنه يمكن فصل الريتينول من زيت كبد الحوت مباشرة بدون تصبن أو استخلاص . فهذا العمود يمكنه إزالة الجلسريدات الثلاثية من العينة ويخرج منه الريتينول (elute) بمذيب عالى القطبية (٩٢٪ ميثانول و ٨٪ ماء) حيث يضاف لعمود الـ HPLC الأصلى .

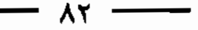
وقد امكن استخدام أعمدة ألومينا غير منشطة بماء (٥٪) لتقدير الريتينول فى الأغذية ، فقد حقن فى الجهاز متسخلص الهكسان للمواد الغير متصبنة وتمت عملية الإحلال بميثانول ٣٪ فى بنزين ، وكشف عنه بقياس فلورته . وزودت هذه الأجهزة بجهاز قياس الفلورة fluorimetry ، كماأمكن فصل المشابهات الهندسية geometric لخلات الريتينيل باستعمال أعمدة microparticalate (5µm) silica أو أعمدة Pellicular (30 µm) silica . ويجب على الباحث المحلل للريتينول الحذر من حدوث تكسير decomposition أو تغيره إلى مشابه أخر isomerisation أثناء التحليل .

حـ - الطرق الحيوية Bioassay Procedures :-

للاختبارات الحيوية أهمية نفع كبيرة ولا يمكن أستبدالها بالطرق الكيميائية أو الطبيعية المتخصصة . ويمكن تقييم الأستجابة الفسيولوجية بإعطاء الـ provitamins أو مخلوط منها أو فيتامين أ نفسه فقط بالطرق الحيوية . ومن أهم مميزات الطرق الحيوية ، هو اعتمادها على كل التغيرات الحيوية المختلفة للفيتامين من حيث الأمتصاص absorption والتمثيل الغذائى metabolism والتخزين storage وما تأخذه الأنسجة uptake والنقل transport ، وعليه فهى تعطى صورة كاملة وواضحة للفيتامين أو مشتقاته بعلاقة كل هذه العوامل مجتمعة مع بعضها .

معظم الطرق الحيوية الشائعة المستخدمة فى فيتامين أ كلاسيكية وتتضمن أختبارات أستجابة النمو growth - response فى فئران تعانى من نقص فيتامين أ (Vit . A-deficient rats) ، وتقدير مدى تخزينه فى الكبد liver storage assay فى الفئران والدجاج ، وتكنيك Vaginal smear .

وفى التقدير الوزنى للفئران الكلاسيكى ، تتبع الخطوات السابق اشارة إليها فى الطرق الحيوية ، وتسجل فيها الاستجابة فى الوزن بالجرامات كل أسبوع (الزياده فى الوزن) ،



salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

وترسم العلاقة البيانية مع لوغاريتم الجرعة المعطاه log of the dose لفيتامين أ all -trans retinyl acetate (المنحنى القياسى) . وبمقارنة نتائج مجموعة الـ unknown بالمنحنى القياسى يمكن ايجاد تركيز الفيتامين فيها .

وحيث أن عامل الاستجابة المستخدم فى هذه التجارب (النمو) غير متخصص ، لذا أستخدمت حديثاً أنظمة زراعة الأعضاء والخلايا organ and cell culture فى قياس النشاط الحيوى لفيتامين أ . وفى هذه الطرق يتم تنمية الخلايا الطلائية للقصبة الهوائية tracheal epithelium المأخوذة من حيوانات تعانى من نقص فيتامين أ أو التى تميل الى التكرتن keratinization . كما تؤخذ خلايا طلائية من جلد فأر حديث الولادة newborn mouse skine يعانى من نفس الحالة ، وتنمى هذه الخلايا فى بيئة زراعة أنسجة مناسبة خالية من فيتامين أ Vit . A - free tissue culture media . وعند اضافة مشتقات فيتامين أ المتنوعة إلى البيئة بجرعات متدرجة يمكن تقييم سعتها بعكس عملية التكرتن reverse keratinization (فى حالة زراعة العضو القصبى) أو بزيادة تخليق الـ RNA (فى حالة زراعة خلايا بشرة الجلد epidermal cells)، ويتم ايجاد العلاقة النهائية بين النشاط الحيوى النسبى لمشتقات الفيتامين وكميته . وفى هذه الاختبارات يجب أن تقارن النتائج المتحصل عليها بالطرق الكلاسيكية .

والطرق الحيوية ذات ميزة هامة حيث أنها تعتمد على كل التغيرات الحيوية المختلفة للفيتامين من حيث امتصاصه وتخزنيه وتمثيله الغذائى ، ولذلك فإنها تعطى صورة واضحة للفيتامين وعلاقته بهذه العوامل مجتمعة .

كما يمكن استخدام عامل استجابة أخر بتقدير السمية toxicity فى بيئة العضو القصبى باستعمال تركيزات مختلفة لمشتقات فيتامين أ . واستخدم هذا التكنيك فى استعراض تأثير الريتينويدات retinoids ومشابهاتها المخلقة على نشاطها االحيوى وسميتها .

وأمكن استخدام عامل استجابة آخر فى التقدير وهو تقدير كبريتات الكوندريتين chondrititin sulphate ، حيث وجد أن الفيتامين يقوم بدور معاون أنزيمى coenzyme فى تخليقه . فكلما زاد تركيز الفيتامين زاد معه مقدار تخليقها . وفى هذه الطريقة يستنفذ الفيتامين من الحيوانات ثم تعطى كميات معينة من الفيتامين وعلى مراحل متتابعة ، ثم تؤخذ عينات من المفاصل النامية فى صورة شرائح وتصبغ بصبغات متخصصة للكوندريتين ويلاحظ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مقدار الزيادة فيها بالمقارنة بكمية الفيتامين المضافة (histochemistry) ، وتقارن العينة المراد تقديرها مع المجموعة القياسية . ويعاب على هذه الطريقة صعوبتها مقارنة بالطرق السابقة .

اختبار قياس كفاءة الجسم على استعمال فيتامين أ

The Vit.A tolerance test

تنحفض مستويات فيتامين أ فى سيرم الاطفال المصابة بتليف تكيسى فى البنكرياس cystic fibrosis of pancreas وفى البالغين adults المصابين بالعجز أو النقص فى افراز البنكرياس (النقص البنكرياسى) pancreatic insufficiency حيث تنخفض عن المدى العادى normal بـ ١٥ - ٦٠ µg لكل ١٠٠ مل . وأعطاء كميات كبيرة من فيتامين أ فى زيت عن طريق الفم oral administration يسبب فقط زيادات بسيطة جداً (تافهة) فى محتوى السيرم من فيتامين أ فى هذه المرضى نظراً لنقص كفاءة امتصاص الدهون وبالتالى فيتامين أ المصاحب لها . أما الأشخاص السليمة ذات الامتصاص الطبيعى لفيتامين أ من الأمعاء فتتراوح زيادة فيتامين أ فى السيرم من ٢٠٠ إلى ٦٠٠ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل سيرم عند أعطاء الفيتامين بنفس الطريقة .

الطريقة Technique : -

يتم تصويم الشخص تحت الدراسة وتؤخذ منه عينة دم يفصل منها السيرم ويقدر فيها محتوى فيتامين أ ، ثم يعطى ٥٠٠٠ وحده / كجم من وزن الجسم من الفيتامين (فى زيت) عن طريق الفم . ثم تؤخذ عينات الدم بعد ٣ و ٧ و ٢٤ ساعة ثم يقدر فيها مستوى فيتامين أ . ويمكن اعطاء المرضى ماء للشرب أو يتناولوا وجبة خفيفة أثناء الـ ٦ ساعات الأولى ، أما أثناء الـ ٦ ساعات التالية فيمكن تناول وجبة كاملة full meal ، ثم بعد ذلك يجب أن يصوم حتى آخر زمن التجربة (٢٤ ساعة) ،ثم يوقع ذلك على صورة منحنى قياسى ومنه يمكن معرفة مدى الاستجابة لامتصاص الفيتامين .

تقدير فيتامين أ : -

عند تقدير فيتامين أ كمياً ، يجب أن يؤخذ فى الأعتبار نوع المصادر الطبيعية المواد تقدير الفيتامين فيها ونفرق بين محتوى الفيتامين Vit . content وفاعليته potency وعلى الأخص الكميات المتاحة حيوياً وفسيولوجياً والكاروتينيدات ، حيث أن هناك تباين بينهم فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفاعلية . علاوه على ذلك فقد يتأثر النشاط الحيوى بكل من : -

١ - محتوى العليقة من الدهن .

٢ - طبيعة هذه الدهون .

٣ - الحالة الطبيعة لحامل الفيتامين Vit. carrier . فمثلا لو كان وسط أنتشار فيتامين أ مائياً aqueous media ، يكون الفيتامين أكثر أمتصاصاً عنه فى الوسط الزيتى oil media .

وبذلك هناك أختلاف بين المحتوى الفيتاميني والنشاط الحيوى الحقيقى للفيتامين .

تفاعل ثالث كلوريد الأنتيمون (كار - بريس) : -

يتم أجراء الأختبار فى أنبوبه نظيفة جافة تماماً تحتوى على ٢مل (ml) من محلول ٢٠٪ زيت كبد الحوت فى الكلوروفوم ثم يضاف نقطة من أندريد الخليك ، ثم يضاف بسرعة ٢ مل من محلول مشبع من ثالث كلوريد الأنتيمون فى كلوروفورم . يلاحظ ظهور لون أزرق يمكن قياسه (لاحظ التغير فى اللون ، فسرعان ما يختفى) .

الأختبار اللونى لفيتامين أ (Stroev and Makarava, 1989) : -

يعتمد الأختبار على التفاعل اللونى للريتينول مع حمض الكبريتيك المركز . فحقيقة هذا الأختبار هى إن حمض الكبريتيك المركز ينزع (يأخذ) ماء من الريتينول ويعطى نواتج ملونة بلون أزرق تتحول بالتدريج إلى لون بنى - أحمر .

الجواهر الكشافة Reagents : -

١- زيت سمك fish oil (غنى بالريتينول)

٢ - كلوروفورم

٣ - حمض كبريتيك مركز .

التكنيك Technique : -

١ - فى أنبوبة أختبار نظيفة يوضع نقطتين من زيت سمك و٥ نقط كلوروفورم ، ثم يضاف نقطة أو أثنين من حمض الكبريتيك المركز .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ - يظهر لون أزرق يتحول بالتدريج الى لون بنى محمر .

فصل المشابهات الهندسية لفيتامين أ (Groenendijk et al ., 1980)

يمكن فصل الريتينويدات retinoids بأستخدام تكنيك كروماتوجرافى الادمصاص على السيليكا جيل وأكسيد الألومنيوم ، ومع تكنيك الـ TLC أمكن فصل المشابهات الهندسية geometric isomers (all - trans , 9- cis , 11 - cis and 13 - cis) لكل من الريتينول واسترات الريتينول والريتينال ألدهيد ، ويجرى الفصل غالباً على السيكاجيل . ويمكن رؤية الـ spots بعد الفصل بتعريض الكروماتوجرام للأشعة فوق البنفسجية حيث تظهر وميض UV- excited fluorecence ، أو برش الكروماتوجرام بجواهر كشافة تعطى لون مع هذه المشابهات . ومن هذه الجواهر ثالث كلوريد الأنتيمون $SbCl_3$ وثلاثى فلورو حمض الخليكTFA وثلاثى كلورو حمض الخليك TCA . وجدول (١٨) يبين الألوان المختلفة للريتينويدات على كروماتوجرام TLC . عند رشها بهذه الجواهر أو بالأشعة فوق البنفسجية .

Colorimetric determination of retinoids on thin-layer chromatograms

Method	Color			
	Retinol	Retinaldehyde	Retinal oxime	Retinyl ester
Antimony trichloride	Blue	Bluegreen	Orange-brown	Blue
Trifluoro-acetic acid	Greenish blue	Yellow	Orange	Greenish blue
Trichloro-acetic acid	Bluegreen	Brownish	Reddish	Bluegreen
UV fluores-cence	Yellow	-	Orange	Yellow

جدول (١٨) الألوان المختلفة للريتينويدات عند رشها بالجواهر المختلفة أو تعريضها لـ UV على كروماتوجرامات الـ TLC

تقدير فيتامين أ فى زيت كبد الحوت

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول KOH ١٠٪ :- ٥ جم فى ٥٠ مل ماء .

٢ - أيثير ثنائى الأيثايل

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

٣ – إيثانول .

٤ – كبريتات صوديوم لامائية .

٥ – جوهر $SbCl_3$: – ويحضر بإذابة ٢٥٠ جم $SbCl_3$ فى ١٠٠ مل كلوروفورم (هذا المحلول ثابت لمدة شهر) .

٦ – دليل فينول فيثالين .

الطريقة : –

أ– التصبن Saponification : –

١ – فى دورق جاف معروف وزنه بالضبط تفتح ١٠ كبسولات capsules زيت كبد الحوت وتغسل بإيثير بترولى ، وبعد تطاير المذيب يوزن الدورق مرة أخرى . ومن الفرق يمكن ايجاد وزن زيت كبد الحوت .

٢ – يضاف ٣٠ مل ايثانول و٣ مل محلول KOH ١٠٪ .

٣ – يسخن الدورق تحت مكثف عاكس reflux لمدة ٣٠ ق لتمام التصبن . وللتأكد من تمام التصبن ، تضاف كمية قليلة من الماء ثم الرج . فإذا ظهر لون بنى أو كتل غير متصبنة ، تكون العملية غير تامة ، ويرجع ذلك إلى زيادة كمية المواد الغير متصبنة .

٤ – بعد التأكد من تمام التصبن يترك الدورق ليبرد إلى درجة حرارة الغرفة .

٥ – ينقل المحلول المتصبن كمياً فى قمع فصل نظيف ويتم ذلك بغسل الدورق بـ ٣٠ مل ماء مقطر على مراحل وينقل ناتج الغسيل إلى قمع الفصل .

ب – الاستخلاص Extraction :–

١) يغسل الدورق بواسطة ٥٠ مل إيثير ويضاف ناتج الغسيل إلى قمع الفصل .

٢) يرج قمع الفصل بأحتراس مع فتح الصنبور (لزيادة الضغط pressure) .

٣) تُأخذ الطبقة المائية فى قمع فصل آخر ، وتغسل بواسطة ٣٥ – ٥٠ مل إيثير .

٤) تجمع الطبقة الأيثيرية فى قمع فصل وتغسل بواسطة ٥٠ مل ماء وتهمل الطبقة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المائية أيضاً .

٥) بعد ذلك تترك الطبقة الأيثيريه لمدة ١٠ ق ، و فى حالة وجود أى أثار من الماء يتم التخلص منها أيضاً .

جـ - التخلص من المذيب Solvent removal : -

١ - يتم ترشيح المستخلص الايثيرى خلال كبريتات صوديوم لامائية (على قمع ترشيح) .

٢- تكمل الطبقة الإيثيرية الجافة بالإيثير إلى حجم معلوم فى دورق معيارى جاف .

د - التقدير Assay : -

١ - يؤخذ ١٠ مل من المستخلص الإيثيرى وتوضع فى أنبوبة اختبار نظيفة ويتم تطاير المذيب بغاز نيتروجين حتى لا يتأكسد الفيتامين ، ثم يضاف إليها ٣ مل من جوهر $SbCl_3$ ويقاس اللون مباشرة على طول موجه ٦٦٠ nm . ومن خلال المنحنى القياسى (بين محاليل قياسية من الفيتامين واللون الناتج) يمكن ايجاد تركيز الفيتامين والبروفيتامين معاً .

٢ - يؤخذ ١٠ مل أخرى فى أنبوبة نظيفة أخرى ، وبعد تطاير المذيب بنفس الطريقة يضاف اليها ١٠ مل ايثير بترولى ويقاس اللون على طول موجه ٤٤٠ nm . ومن خلال المنحنى القياسى يمكن معرفة كمية البروفيتامين .

تقدير فيتامين أ فى المستحضرات الطبية طبقاً لطريقة (USP , 1985)

تُتبع هذه الطريقة لتقييم المستحضرات الطبية فى محتواها من فيتامين أ ، وهى الطريقة المعتمدة من الجمعية العالمية للكيمياء البحتة والتطبيقية (IUPAC) International Union of Pure and Applied Chemistry . وتتضمن الطريقة أستخلاص الفيتامين فى ظروف خاصة للمحافظة على تركيبه من الأكسدة ، ثم قياس الامتصاصات على أطوال موجية مختلفة فى منطقة UV (٣١٠ و ٣٢٥ و ٣٣٤ nm)

ويتم استخلاص الفيتامين بالكامل من المواد الغيرمتصبنة للعينة بالايثير (الخالى من البيروكسيدات) مع المحافظة على الفيتامين سليم قدر الامكان وذلك عن طريق عدم تعرض الفيتامين للضوء العادى و الأكسيجين الجوى والعوامل المؤكسدة الأخرى قدر الإمكان أو

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أقل مــا يمـكن ، ويتـم ذلك بأستعمــال أدوات زجـاجية غير منـفذه للضوء و ظـروف غــاز خامل inert gus .

الجواهر الكشافة Reagents : -

١ - أيثير Diethyl ether : يستعمل أيثير حديث التحضير ويستخدم خلال ٢٤ ساعة الأولى من تقطيره .

٢ - كحول أيزوبروبيل Isopropyl alcohol (AR) .

٣ كحول أيثايل مطلق (AR) .

٤ - محلول هيدروكسيد بوتاسيوم (AR) : - ٩ أجزاء فى ١٠ أجزاء .

التكنيك Technique : -

١ - يوزن بالضبط جزء من العينة المختبرة أو يؤخذ عدد معين منها (فى حالة وجودها فى صورة أقراص مثلاً) أو يؤخذ حجم معين منها (لو كان المراد نسبتها إلى الحجم) ، ثم تنقل كمياً إلى دورق زجاج بوروسيليكات مناسب borosilicte gloss . وكمية العينة (وزنها أو حجمها أو عددها) يكون على أساس المتوقع أن يكون فيها من الفيامين . وتوصى هذه الطريقة بأن تكون كمية العينة تحتوى على مكافئات ريتينول لاتقل عن ٠,١٥ ملجم ولا يزيد الدهن فيها عن ١ جم .

٢ - لو كانت العينة فى صورة كبسولات capsules أو أقراص tablets أو أى صورة صلبة أخرى فلابد من تجهيزها حتى تتم عملية التصبن بكفاءة وعلى أكمل وجه . ولأجراء ذلك تتبع الأجراءات التالية : - تتم عملية refuxing للجزء المأخوذ للتقدير مع ١٠ مل ماء فى حمام بخار steam bath لمدة حوالى ١٠ ق ، و تسحق cruch الاجزاء الصلبة الباقية بساق زجاجى غير حاد ثم تدفىء لمده ٥ ق أخرى ، ثم تنقل جميع المحتويــات كمــياً إلــى دورق زجــاج (بورو سيليكات) مناسب.

٣ - يضاف إلى المحتويات ٣٠ مل كحول و ٣ مل محلول هيدروكسيد بوتاسيوم ، ثم تتم عملية الـ refluxing فى وحده كلها من زجاج البوروسيليكات لمدة ٣٠ ق . وبعد أن يبرد المحلول يضاف ٣٠ مل ماء ، وتنقل إلى قمع فصل ويضاف إليها ٤ جم مسحوق كبريتات صوديوم (بها ٨ جزيئات ماء) ناعمة جداً .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤ – تستخلص المواد الغير متصبنه أولاً بواسطة١٥٠ مل أيثير لمدة دقيقة ثم تستخلص بالأيثير ثلاث مرات أخرى ، كل منها ٢٥ مل ، وتجمع المستخلصات وتغسل بـ ٥٠ مل ماء مع التقليب الدوامى swirling برفق . يعاد الغسيل بالماء ٣ مرات وفى كل مرة يستخدم ٥٠ مل ماء مع زيادة التقليب .

٥ – ينقل المستخلص الأيثيرى المغسول الى دورق معيارى ٢٥٠ مل يكمل إلى العلامة بالأيثير ثم يخلط جيداً .

٦ – يؤخذ ٢٥ مل من مستخلص الأيثيرى ويبخر إلى حوالى ٥ مل (بدون أستعمال حرارة ويمكن أجراء ذلك بالتبخير تحت تفريغ vacuum أو بتمرير غاز خامل فيها) ، يستمر التبخير حتى حوالى ٣ مل ثم تذاب فى كمية من كحول الأيزوبروبيل بحيث تعطى تركيز متوقع مايعادل من الفيتامين ٣ – ٥ µg لكل مل أو تعطى أمتصاص فى المدى ٠,٥ – ٠,٨ على طول موجه ٣٢٥ nm .

٧ – يقاس الأمتصاص فى المحلول الناتج على أطوال موجية ٣١٠ و ٣٢٥ و ٣٣٤ nm فى وجود كحول الأيزوبروبيل كبلانك ، وخلية قياس كوارتز بأستعمال جهاز سبكتروفوتومتر مناسب .

الحساب Calculation : -

يحسب محتوى فيتامين أ من المعادلة التالية : –

$$\text{Content (in mg)} = 0.549\ A_{325} / LC$$

حيث أن : – A_{325} هى مقدار الأمتصاص الملاحظ على طول موجة ٣٢٥ nm .

L هى مسار الضوء فى خلية القياس بالسم .

C هى كمية العينة المختبرة المعبر عنها بالجم (g) أو كبسولات أو أقراص فى كل ١٠٠ مل من محلول الأيزوبروبيل النهائى .

وهذه المعادلة تطبق بشرط أن : –

A_{325} لها قيمة لا تقل عن $|A_{325}| / 1.030$ | ولا تزيد عن $|A_{325}| / 0.970$ حيث أن $|A_{325}|$ هى corrected absorbance على طول موجة ٣٢٥ nm والذى يحسب من المعادلة التالية :-

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

$$[A_{325}] = 6.815\ A_{325} - 2.555\ A_{310} - 4.260\ A_{334}$$

حيث A تدل على الأمتصاص على طول الموجة المستدل عليها بالرقم الملحق بها .

لو كانت قيمة $[A_{325}]$ كان لها قيمة أقل من $A_{325} / 1.030$ فانه تطبق المعادله التالية :-

$$\text{Cantent(in mg)} = 0.549\ [\ A_{325}] / LC$$

كل واحد ملجم فيتامين أ(الصورة الكحوليه) تمثل ٣٣٣٣ وحده USP من فيتامين أ.
ومما هو جدير بالذكر أنه فى حالة وجود التوكوفيرول مصاحب لفيتامين أ ، فإنه يتداخل فى التقدير لأن التوكوفيرولات لها أمتصاصات على الأطوال الموجيه الخاصة بفيتامين أ ، لذلك فيجرى على هذه الطريقة تعديلات جوهرية لأزالة هذا التداخل ، والطريقة المعدله منشورة فى نفس المرجع USP ,1985 .

تقديرالريتينول فى السيرم بالطريقة الأسبكتروفوتومترية

(Varley et al., 1976)

الأساس المبنى عليه هذه الطريقة هو أستخلاص الريتينول أولاً ثم قياس أمتصاصة على طول موجة ٣٢٧ nm (أقصى امتصاص) وبعد تشعيعة irradiating فى منطقة الأشعة الفوق بنفسجية يتلف ، و يقاس الأمتصاص مرة أخرى على نفس طول الموجة ، والفرق فى القياسين يعبر عن كمية الريتينول .

الجواهر الكشافة : -

١ - كحول مطلق .

٢ - هبتان عادى n - heptane (خالى من الهيدروكربونات العطرية) .

٣ - محلول قياسى من الريتينول (١,٠ ملجم / مل هبتان) .

التكنيك : -

١ - يخلط ٤,٠ مل من السيرم أو البلازما المعاملة بالهيبارين مع٨,٠ مل كحول مطلق و ٨,٠ مل هبتان عادى .

٢ - يرج المخلوط جيداً لمدة ١٥ ق بواسطة جهاز رج ميكانيكى ، ثم يترك حتى تنفصل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

طبقاته .

٣ – تؤخذ طبقة الهبتان وتقسم قسمين متساوين تقريباً ، وتشعع أحداهما فى أنبوبة زجاج صودا sada glass بغطاء لمدة ٣ ساعات بواسطة ضوء UV ، وهذا الزمن كافى لتلف كل الريتينول .

٤ – يقاس امتصاص المحلول الغير مشعع على طول موجة ٣٢٧ nm ضد الجزء المشعع كبلانك ، ثم يحسب التركيز من منحنى قياسى تم تحضيره بنفس الطريقة.

٥ – يمكن تحضير محاليل المنحنى القياسى من خلط المكونات التالية كما هو موضح فى الجدول التالى : –

المحلول القياسى (مل)	صفر	١,٠	٢,٠	٣,٠	٤,٠	٥,٠
الهبتان (مل)	١٠	٩	٨,٠	٧,٠	٦,٠	٥,٠

هذا ويمكن استعمال حجم أقل من السيرم ،كما يمكن حفظ مستخلص الهبتان سواء المشعع أو الغير مشعع فى الثلاجة على ٤° م حتى فترة تبلغ ٤٨ ساعة بدون أى تغيير يحدث .

التفسير : –

كثير من الباحثين وجد أن المدى الطبيعى المقدر بهذه الطريقة يتراوح بين ٠,٣٠ و ٠,٩٠ ملجم / لتر .

اختبار امتصاص فيتامين أ (Wooton and King, 1959)

يعد اختبار الميزان الدهنى fat balance أحد التطبيقات العملية لدراسات توازن التمثيل الغذائى فى الجسم . وتبلغ نسبة امتصاص الدهن fat absorption فى الأشخاص الطبيعة ٩٥٪ أو اكثر عندما يتناولون ١٠٠ جم دهن ، ولكن فى حالة قلة نسبة أمتصاص الدهن عن ٩٠٪ فيكون هناك حالة تسمى الاسهال الشحمى steaorrhoea ، ولكن هذا الأختبار لا يحدد سبب النقص فى امتصاص الدهن . ومن ناحية أخرى، يمكن اجراء اختبار أمتصاص فيتامين أ (أسهل بكثير من أجراء أختبار الميزان الدهنى) كاختبار يحل محل أختبار الميزان الدهنى ، كما يعد هذا الأختبار أيضاً اختباراً وظيفياً functionaltest لكفاءة امتصاص فيتامين أ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فى هذا الأختبار يتم تقدير مستوى فيتامين أ فى البلازما أولاً ، ثم تعطى جرعة من فيتامين أ معروفة التركيز بالضبط عن طريقة الفم ، وبعد ٤ ساعات تؤخذ عينة دم أخرى ويقدر مستوى فيتامين أ فى البلازما . فإذا أرتفع مستواه عن المستوى الأول أرتفاعاً كافياً يزيد بمقدار ٥٠٠ IU فى كل ١٠٠ مل بلازما ، كان ذلك دلالة على عدم وجود نقص فى امتصاص الدهن وفيتامين أ .

طريقة أجراء الأختبار : -

١ - لا يصوم الشخص تحت الاختبار أثناء أجراء الاختبار لأن الصيام يتعارض مع أمتصاص فيتامين أ ، ويعطى الشخص جرعة قدرها ٣٥٠٠٠٠ IU من فيتامين أ على صورة محلول فى زيت .

٢ - تؤخذ عينة دم عند بداية التجربة وبعد أعطاء جرعة الفيتامين بزمن قدره ٤ ساعات.

٣ - تفصل البلازما من عينه الدم بأستعمال الهيبارين كمادة مانعة للتجلط .

٤ - يقدر تركيز الفيتامين فى البلازما بأى طريقة مناسبة ويحسب تركيزها بالنسبة لكل ١٠٠ مل بلازما .

الكاروتينويدات Carotenoids

هناك أكثر من ٨٠ نوع من الكاروتينويدات توجد طبيعياً ، ولكن فقط حوالى ١٠ منها له نشاط فيتامين . وأكبرها نشاطاً هو البيتاكاروتين وهو يستخدم كعامل غذائى للتلوين food coloring agent .ويمكن تقسيم الكاروتينويدات الى نوعين على حسب وجود أو عدم وجود الأكسجين فيها الى : -

١ - كاروتينات هيدروكربونية Hydrocarbonated carotenes .

٢ - كاروتينات هيدروكسيلية Hydroxylated carotenes .

وشكل (٢٢) يوضح التركيب البنائى لأهم الكاروتينويدات المنتشرة فى الطبيعية .

وفى طرق تحليل الكاروتينويدات استفيد من هذا الفرق فى فصلهما عن بعضها لبعض ،

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وتتعقد طرق فصل وتقدير الكاروتينويدات لكثرة مشابهاتها ، فمثلا يحتوى البرتقال على حوالى ٣٢ نوع منها .

شكل (٢٢) الصيغة البنائية لأهم الكاروتينويدات المنتشرة فى الطبيعة

١ - الأستخلاص : -

الكاروتينويدات حساسه للحرارة والضوء والأكسجين ، لذلك يجب المحافظة عليها من ضوء الشمس المباشر عند أستخلاصها قدر الأمكان، ولابد من حماية المحاليل من الأكسدة بأحاطتها بمناخ من النيتروجين أو أضافة مواد مضاد(مانعه) للأكسده إليها .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ويجب تلافى تأثير الحرارة الزائدة عند اجراء التصبن ، ويستحسن أن تتم هذه العملية على درجة حرارة الغرفة . وعملية التصبن غير ضرورية لتحليل كاروتينات المواد النباتية ولكن لو قدرت الزانثوفيلات xanthophylls فلابد من أجراء تصبن لأن الزانثوفيلات النباتية غالباً ما توجد كأسترات (عادة laurates). وفصل استرات الزانثوفيل عن الكاروتينات أكثر صعوبة عن فـصل الكحـول الحـر والكاروتينات لأن قطبيـة polarity الإسترات مسـاوية لقطبيـة الكاروتينات.

يمكن أجراء تقدير محتوى الكاروتين فى المواد النباتية مباشرة فى مستخلصات المذيب العضوى ، والطريقة الرسيمة AOAC توصى بالاستـخلاص بواسطة أسيتـون - هكسـان (٤٠ : ٦٠) يحتوى على كمية صغيرة من كربونات الماغنسيوم لمعادلة الحموضة ثم يجرى التقدير . وقد وجد أن الخلايا النباتية المتقطعة ruptured تفرز أنزيم يتلف الكاروتينويدات ، لذلك يوصى بإجراء التحليل بسرعة قدر الإمكان بعد تجنيس المادة الطازجة . وإذا لم يتيسر التحليل السريع كما هو موصى به ، فلابد من غمر immerse المادة فى مـاء يغلى لمدة ١٠ - ١٥ ق حتى يوقف نشاط الأنزيم to deactivate the enzyme ، ويمكن بعد ذلك حفظ العينة فى صورة مجمدة frozen .

ويوصى عند أجراء التصبن على الساخن بأيدروكسيد بوتاسيوم كحولى بأنه لابد من وجود مادة مضادة للأكسده عند تحليل محتوى الكاروتين للأغذية الدهنية مثل المارجرين . وعادة ما يتم التصبن على درجه حرارة الغرفة بترك العينة تتصل مباشرة بالبوتاسا الكاوية الكحولية لمدة ١٢ ساعة (طوال الليل overnight) تحت غاز النيتروجين كلما أمكن لتمام التصبن . ولتقدير محتوى الكاروتينويدات فى عصائر الفاكهة fruit juices ، يتم تقليب المستخلص النباتى (العصير) مع محلول أيدروكسيد البوتاسيوم لمده ١ - ٢ ساعة فقط تحت غاز النيتروجين ، فهذه المعاملة كافية لتمام التحليل المائى لإسترات الزانثوفيل .

ومن المواد المستخدمة كمانعة للأكسدة أثناء عملية التصبن هى حمض الأسكوربيك أو BHT . وبعد إجراء التصبن يضاف أيثير ثنائى الأيثايل مع أضافة كمية كافية من محلول كلوريد صوديوم مشبع حتى يتكون سطح فاصل واضح (تتكون طبقتين)، ثم تفصل بعد ذلك طبـقـة المذيب والتى تحـتـوى على الكاروتينويدات باستعمال قمع فـصل . ويمكن أزالة الكاروتينويدات بالادمصاص على ماغيسيا magnesia حيث يمرر عصير الفاكهة خلال طبقة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ماغيسيا ثم بعد ذلك تستخلص بمذيب dichloroethane و ميثانول (١ : ١) لأزالة الكاروتينويدات المدمصة .

٢ - الفصل والقياس : -

كل تقديرات الكاروتينويدات فى الاغذية تتم بالقياس الطيفى فى منطقة الاشعة فوق البنفسجية - الضوء المرئى (UV - visible spectophotometry) حيث أن الكاروتينويدات ذات امتصاص قوى جداً فى منطقة الضوء المرئى من الطيف . فالبيتاكاروتين ذات أمتصاص عالى (E_1^1 = 2592) على طول موجه٤٥٣ nm وأيضاً (E_1^1 = 2800) على طول موجه ٤٤٤ nm ، والكريبتوزانثين (E_1^1 = 2370) على طول موجه ٤٥٢ nm . وتتفاعل الكاروتينويدات مع أحماض لويس أيضاً وتعطى نواتج ملونة ، وتستخدم هذه الخاصية فى تقديرها .

ولا يستخدم الـ GC فى تحليلها لعدم ثباتها للحرارة ، وغالبا عند دراسة محتوى الكاروتينويدات فى الأغذية لابد من فصل الكاروتين عن الزانثوفيل ، ويمكن أجراء ذلك الفصل على أعمده بها مخاليط من magnesia - celite . وتبداء عملية الأحلال بمحلول عديم القطبيه non- polar لفصل هيدروكربونات الكاروتين ثم يزداد تدرج القطبية لفصل الزانثوفيلات الأكثر قطبية .

وكثيراً ما تستعمل مخاليط الاسيتون فى أيثير بترولى أو هكسان لهذا الفصل . الكاروتينات مثل الألفا والبيتاكاروتين يمكن أحلالها بـ ٢ - ٥٪ أسيتون فى أيثير بترولى ، ثم بزيادة ألاسيتون من ٥ - ١٠٪ تحل أكسيدات الكاروتين carotene oxide (مثل الـ epoxide) . عند استخدام تركيز أسيتون أكثر من ١٠٪ تبدأ الزانثوفيلات أحادية الهيدروكسيل polyhydroxy يمكن أستعمال محلول أيثانول وأيثير بترولى (١ : ١) .

ويمكن أستعمال كروماتوجرافى التوزيع أيضاً فى فصل الكاروتينات عن الزانثوفيلات، وقد أستعملت أعمده سيلكاجيل مشبعة بميثانول لفصلها ولكن الأنظمة الأكثر كفاءة أستعملت سيفادكس LH - 20 حيث أستخدم هذا النظام سابقاً فى تحليل الريتينول .

واذا كان المطلوب فصل الكاروتينويدات كل على حدى (كل منها بمفردها) فإنه يمكن تطبيق تكنيك الـ TLC بعد الفصل بالأعمده الكروماتوجرافية . ويمكن أستخدام شرائح الطبقة الرقيقة TLC - Plats لمخلوط من أيدروكسيد كالسيوم وسيليكاجيل (٦ : ١) ونظام مذيب

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ايثيربترولى و بنزين (٩٨ : ٢) لفصل الكاروتينات . الأجزاء التى تحتوى على أكاسيد الكاروتين والزنثوفيلات أحادية الهيدروكسيل يمكن فصلها إلى مركباتها على شرائح الطبقة الرقيقة لأكسيد الألومنيوم مع المذيب ٣٪ أسيتون فى ايثيربترولى لأكاسيد الكاروتين ، و ٥٪ أسيتون للزانثوفيلات . وتستخدم شرائح السيليكاجيل لفصل الزانثوفيلات عديدة الهيدروكسيل بعديد من المذيبات ، واختيار المذيب يعتمد على قطبية الزانثوفيلات . ويتركب المخلوط المستخدم فى فصل زانثوفيلات عصير البرتقال من ٢٠ - ٤٠ ٪ أسيتون فى مخلوط أيثيربترولى : خلات الأيثايل : أيزوبروبيل (٩٥ : ١٠ : ٥) .

٣ - HPLC : -

استخدام هذا التكنيك بصورة أدق فى تفريد (تحليل كمى ووصفى) أنواع الكاروتينويدات المختلفة بكثرة فى الوقت الحاضر . واستخدم فيه أنواع مختلفة من الطور الثابت (مثل الماغنيسيا) ويمرر عليها مذيب متدرج فى القطبية (مثل أسيتون - هكسان) . ومن ميزة هذا التكنيك سرعة أجراءة (٢٠ ق) ، ودقته مع المحافظة على المشتقات الناتجة . وعند أستخدام أعمده الماغنيسيا فلابد من مراعاة اعادة تجديد الرطوبة فيها وذلك بغسيلها بأستيون يحتوى على ٥,٢ ٪ ماء وذلك يستغرق ١٠ ق ، ويتم ذلك قبل حقن كل عينة ويحتوى المذيب عادة على مواد مانعة للأكسدة مثل BHT . ولا يستعمل هذا العمود فى تحليل الزانثوفيلات لانها تتطلب أعمده أكثر قطبية مثل السيليكاجيل مع مذيب tetrahydrofuran وهكسان (١: ٥) يحتوى على ٠,٠١ ٪ BHT . ويتم تقدير الكاروتينويدات بهذه الأجهزة بالكشف عنها بكواشف خاصة ، والقياس يكون فى منطقة الضوء المرئى ، وعاده ما يكون الامتصاص على طول موجة ٤٤٠ nm .

تستخلص الكاروتينويدات من العينات بعد التصبن بمذيب يلى عملية التصبن مباشرة ، ثم تحقن المواد الغير متصبنة مباشرة فى عمود الـ HPLC .

٤ - التعرف على الكاروتينويدات : -

حيث إن هناك أنواع كثيرة جداً من الكاروتينويدات ، فلابد من معرفتها بعد الفصل الكروماتوجرافى بكميات كبيرة كافية ، ويتم ذلك بقياس الطيف المرئى visible spectrum للكاروتينيد المفصول فى مذيبات متنوعة مثل الإيثانول وكلوروفورم و carbondisulfide حيث أن مناطق أقصى امتصاص للكاروتينويدات حساسة للمذيب . وعن طريق ذلك يمكن معرفة نوع الكاروتينويد مثل : -

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

β - Carotene	λ max (ethanol)	= 425 , 450 , 478	nm
	λ max (chloroform)	= 465 , 493	nm
	λ max (carbondisulfide)	= 450 , 475 , 505	nm

وهناك جداول خاصة لذلك ، وبمقارنة النتائج المتحصل عليها بهذه الجداول يمكن معرفة أنواع الكاروتينويدات المفصولة . كما يمكن قياس طيفها فى مناطق أخرى مثل MS . NMR . IR spectroscopy .... إلخ ، وتلك أيضاً لها جداول خاصة .

تقدير الكاروتينات بالطريقة الأسبكتروفوتومترية
(Beadle and Zscheile , 1942)

البيتاكاروتين من الكاروتينات الأساسية فى أغلب المصادر النباتية مثل الجزر carrots والألفاألفا alfa alfa ، وذلك بالنسبة للكاروتينات الأخرى مثل الكريبتوزانثين cryptoxanthin والليكوبين lycopene . وربما فى هذه الحالة تحتاج طرق فصل وتقدير الكاروتينات إلى مذيبات متخصصة للأستخلاص مثل : -

١- مخلوط من الهكسان والأسيتون .

٢ - Diacetone alcohol .

وهذا النوع الأخير يستخدم بكثرة وذلك لوجود الكاروتينات مع بعض الصبغات الغير نشطة inactive pigments مثل الزانثوفيل والكلوروفيل .

ويمكن توضيح بعض الاحتياطات المتبعة للاستخلاص تبعاً لنوع العينة كما يلى : -

الاستخلاص : -

نجد أن عملية الاستخلاص تختلف حسب نوع المصدر (حيوانى - نباتى) ويمكن توضيح ذلك كما يلى : -

أ - الاستخلاص من مخلوط المواد الغذائية الجافة و العينات النباتية الجافة : -

حيث يتم الاستخلاص بعد تسخين العينة فى دورق جاف باستخدام مخلوط من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأسيتون والهكسان بنسبة ٣ : ٧ بالترتيب تحت مكثف عاكس under reflux لمدة ساعة ، حيث يتم استخدام ٣٠ مل من مخلوط المذيب لكل ٢ جم من العينة . يتم التبريد إلى درجة حرارة الغرفة ثم الترشيح filteration خلال كبريتات صوديوم لامائية واستقبال الراشح filtrate في دورق معياري سعة ١٠٠ مل .

ب - الاستخلاص من المنتجات اللبنية والحيوانية التي تحتوي على دهون : -

نجد هنا أن عملية الاستخلاص والتصبن تكون ضرورية necessary ، وذلك بغرض الحصول على الجزء الغير متصبن .

خطوات التقدير : -

١ - الجواهر الكشافة : -

١ - بوتاسا كاوية كحولية (N٠,٥) .

٢ - بوتاسا كاوية مائية (N ٠,٥) .

٣ - ايثير ثنائي الإيثايل (خالي من البيروكسيدات) .

٤ - أيثير بترولي (٤٠ - ٦٠° م) .

٥ - دليل الفينول فيثالين .

٢- التصبن : -

يتم أضافة ١٥ مل بوتاسا كاوية كحولية لكل ١جم من العينة وذلك في دورق مخروطي سعة ١٠٠ مل ، والتسخين في حمام مائي water bath لمده ٣٠ ق تحت مكثف عاكس أو يترك على حرارة الغرفة طول الليل overnight .

٣ - الأستخلاص : -

١ - يتم الأستخلاص وذلك باستخدام أيثير ثنائي الأيثايل (١٠٠ مل) ، وعلى دفعات لأستخلاص أكبر كمية ممكنه من الكاروتينات وذلك بعد نقل العينة إلى قمع فصل سعه ٢٥٠ مل (كما سبق في حالة فيتامين أ) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ – يغسل الدورق بحجم مساوى من الماء المقطر Distilled Water (DW) وينقل ناتج الغسيل أيضاً إلى قمع الفصل .

٣ – يتم الاستخلاص بالأيثير ثم تهمل الطبقة المائية .

٤ – تغسل طبقة الأيثير بواسطة ٥٠ مل من البوتاسا الكاويه المائية و ٥٠ مل ماء مقطر وذلك بالترتيب حتى لا تعطى لون أحمر مع دليل الفينول فيثالين .

٥ – تنقل طبقة الأيثير إلى دورق معيارى ويكمل إلى العلامة باستخدام الإيثير .

٦ – يأخذ منها حجم معلوم ويبخر الايثير فى حمام مائى تحت ضغط منخفض ، ثم يضاف ١٠مل من الأيثير البترولى .

٧ – يتم القياس على طول موجة ٤٤٠ nm فى وجود بلانك (أيثير بترولى) .

٨ – يتم عمل منحنى قياسى من البيتاكاروتين وذلك لحساب كمية الكاروتين فى العينة .

٤ – عمل المنحنى القياس من البيتاكاروتين

Standard curve of β-carotene :-

يتم اذابة وزنة معلومة بالضبط من البيتاكاروتين فى حجم معلوم بالضبط من الإيثير البترولى (٠,٠١ جم لكل ١٠٠ مل ايثيربترولى) وذلك لعمل المحلول القياسى Standard solution . يتم تحضير تحت تخفيفات مختلفة subdilutions من هذا المحلول بإضافة المذيب للحصول على محاليل ذات تركيزات مختلفة من الكاروتين كما فى الجدول التالى : –

المحلول القياسى من البيتاكاروتين (مل)	صفر	٠,٢٥	٠,٥٠	١,٠٠	٢,٠٠	٣,٠٠
ايثيربترولى (٤٠ – ٦٠°م) (مل)	١٠	٩,٧٥	٩,٥٠	٩,٠٠	٨,٠٠	٧,٠٠
نسبة الكاروتين (ملجم / مل)	صفر	٠,٥٠	١,٠	٢,٠	٣,٠	٤,٠

٥ – القياس Reading : –

يتم القياس مباشرة على طول موجة ٤٤٠ nm فى وجود بلانك (إيثيربترولى) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويحسب تركيز الكاروتين فى العينة بتطبيق امتصاص العينة على المنحنى القياسى .

تقدير فيتامين أ والكاروتين فى السيرم بتفاعل كار –بريس

(Varley et al ., 1976)

يتم تقدير فيتامين أ والكاروتين لونياً عن طريق التفاعل مع ثالث كلوريد الأنتيمون Carr - price reaction بأستخدام طريقه Kimble and Stekol ، وفيها يتم ترسيب البروتين بأستخدام كحول الأيثايل ثم أستخلاص فيتامين أ والكاروتين باستخدام الأيثير البترولى . وبعد قراءة امتصاص اللون الأصفر على طول موجه ٤٤٠ nm والخاص بتقدير الكاروتين ، يتم تبخير الأيثير البترولى ثم إذابه المتبقى residue فى كلوروفورم و اضافة جوهر كشاف ثالث كلوريد الأنتيمون ثم قراءة اللون الازرق المتكون على طول موجه ٦٢٠ nm .

ملحوظة : – تعطى الكاروتينات لوناً أزرقاً أيضاً مع ثالث كلوريد الانتيمون $SbCl_3$ فى الكلوروفورم .

١ – الجواهر الكشافة : –

١ – كحول أيثايل مطلق .

٢ – ايثيربترولى (٤٠ – ٦٠° م) .

٣ – كلوروفورم .

٤ – أندريد حامض الخليك .

٥ – جوهر كار – بريس : – يحضر بإذابه ٢٥٠ جم ثالث كلوريد الأنتيمون فى لتر من الكلوروفورم (عملية الترشيح ضرورية قبل الأستخدام) .

٦ – محلول قياسى من البيتاكاروتين : – و يحضر بأذابه ٥٠٠ ملجرام بيتاكاروتين فى لتر ايثير بترولى ، ثم يخفف بنسبة ١ : ٥ باستخدام نفس المذيب .

٢ – الخطوات : –

١ – يؤخذ ٣ مل من مصل الدم (السيرم) فى أنبوبة طرد مركزى ثم يضاف اليها ٣ مل كحول أيثايل تدريجياً نقطة نقطة مع الرج ، وذلك لترسيب البروتين .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ - يتم أضافة ٦مل من الإيثير البترولى والرج بشده لمدة ١٠ دقائق ثم إجراء طرد مركزى لمدة دقيقة واحدة .

٣ - تؤخذ طبقة الإيثير البترولى دون نقل أى كمية من الطبقة المائية .

أولاً - تقدير الكاروتين : -

تؤخذ طبقة الإيثير البترولى فى خلية القياسى colorimeteric cuvette ، ثم يقرأ الأمتصاص على طول موجه ٤٤٠ nm فى وجود بلانك (إيثيربترولى) ، ويحسب تركيز الكاروتين فى السيرم من المنحنى القياسى باستعمال المحلول القياسى كما فى الجدول السابق (تحت التخفيفات المختلفة subdilutions).

ثانياً - تقدير فيتامين أ : -

١ - يؤخذ ٤ مل من مستخلص الإيثير البترولى فى أنبوبة القياس ، ثم يبخر المذيب فى حمام مائى على (٤٠ - ٥٠° م) مع أمرار تيار من CO_2 أعلى سطح المذيب .

٢ - يتم إذابة الطبقة المتبقية residue فى ٠.٥ مل كلوروفورم ، ثم تضاف نقطة من أندريد حمض الخليك وذلك للقضاء على آثار من الماء والتى تسبب تغبش cloudiness المحلول عند أضافة جوهر كار- بريس .

٣ - يتم بسرعة أضافة ٣ مل من جوهر كار - بريس بحيث يكون طرف الماصة بعيداً عن سطح المخلوط ، فيظهر اللون الذى يقاس على طول موجة ٦٢٠ nm . ويظهر اللون بسرعة ويبلغ أقصاه فى خلال ٥ - ١٥ ثانية ثم يقل بسرعة . وثبات اللون يكون أكثر عند تبريد جوهر كار- بريس على درجة حراره ٥ الى صفر ° م قبل الاستخدام .

ملحوظة : -

عند وجود إى آثار من الرطوبة فى الكلوروفورم أو جوهر كار- بريس يكون من المستحيل قراءة اللون . وإذا ظهر تغبش يعاد التقدير . هذا ويجرى تصحيح للون الناتج حيث أن الكاروتينات الموجوده مع الريتينول تتفاعل مع جوهر كار - بريس وتعطى نفس اللون .

٤ - يحضر منحنيان قياسيان على نفس الجهاز ، الأول لتفاعل الريتينول مع جوهر كار - بريس ، والآخر للكاروتينات مع الجوهر أيضاً وتعامل بنفس الطريقة . ثم من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

نتائج تقدير مستوى الكاروتينات فى السيرم ، تقراء كثافة اللون التى ترجع لنفس كميـة الكاروتـين من المنحنى القـيـاسى الخـاص بالكاروتين ، وبعد ذلك تطرح هذه القيمة من القراءة الفعلية الخاصة بتقدير الريتينول فى العينة . وبتطبيق هذه القراءة على المنحنى القياسى الخاص بالريتينول يمكن حساب كمية الريتينول فى السيرم بدون تداخلات للكاروتينات فى التقدير . ومما هو جدير بالذكر ، يجب تصحيح الحجوم أيضاً ، ففى تقدير فيتامين أ يستخدم ٤ مل من مستخلص الأيثير البترولى للتقدير ، فلو استخدم حجم أقل فإنه يضرب فى ٤ ويقسم على الحجم المأخوذ للتقدير .

٥ – أ – منحنى الريتينول القياسى : – يحضر محلول يحتوى على ٤,٠ ملجم ريتينول / لتر فى كلوروفورم وتجهز سلسة أنابيب كما فى الجدول التالى : –

المحلول القياسى من فيتامين أ (مل)	صفر	٠,٠٥	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٥٠
كلوروفورم (مل)	٠,٥٠	٠,٤٥	٠,٤٠	٠,٣٠	٠,٢٠	٠,١٠	صفر
كمية فيتامين أ فى مصل الدم (ملجم / لتر)	صفر	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٤٠	٠,٦٠	٠,٨٠	١,٠٠

ثم يضاف ٣ مل جوهر كار – بريس والقياس كما سبق ذكره .

٥ – ب – منحنى تصحيح الكاروتينات : – تحضر محاليل مختلفة من البيتاكاروتين وذلك بتخفيف مل واحد من المحلول القياسى السابق من البيتا كاروتين إلى ٢٥ مل بواسطة الكلوروفورم (نحصل على محلول يحتوى على ٢٠ ملجم / لتر) . وتحضر سلسلة من الأنابيب كما فى الجدول التالى : –

محلول قياسى من الكاروتين (مل)	صفر	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٥٠
كلوروفورم (مل)	٠,٥٠	٠,٤٠	٠,٣٠	٠,٢٠	٠,١٠	صفر
كمية الكاروتين فى مصل الدم (ملجم / لتر)	صفر	٠,١٠	٠,٢٠	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٥٠

ثم يضاف ٣ مل من جوهر كار – بريس والقياس كما سبق ذكره .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تقدير الريتينول والكاروتينات فى السيرم بواسطة ثلاثى كلورو حمض الخليك .

إن طريقة تقدير الريتينول والكاروتينات التى تعتمد على تفاعل كار - بريس والتى يستعمل فيها ثالث كلوريد الأنتيمون فى الكلوروفورم مازالت تستخدم حتى الآن ولكن لها عيب ألا وهو تكون أكسى كلوريد الأنتيمون الغير ذائب insoluble antimony oxy chloride (SbOCl) فى وجود اى رطوبة وهذا يسبب صعوبة التقدير. ولكن هناك تفاعل آخر يعطى لوناً أزرقاً مع فيتامين أ والكاروتينات وليس فيه هذا العيب ويستخدم فيه ثلاثى فلورو حمض الخليك TFA بدلاً من $SbCl_3$.

يتفاعل ثلاثى كلورو حمض الخليك مع الألكترونات باى π electrons فى الروابط الزوجية المتبادلة لفيتامين أ ويتكون مركب كيميائى له لون أزرق ، ويسمى هذا التفاعل باسم تفاعل Neeld - Pearson . ويتميز هذا التفاعل أيضاً بزيادة حساسيته وتخصصه حيث تتفاعل الكاروتينات أيضاً مع الـ TFA ، ولكن لتقديرها يتم تطبيق تصحيح للأمتصاص المصاحب للكاروتينات .

وفى هاتين الطريقتين يتم ترسيب بروتينات السيرم بالكحول ثم يستخلص بعد ذلك الريتينول والكاروتينات بواسطة الإيثير البترولى . وبعد قياس كثافة اللون الأصفر فى هذا المستخلص على طول موجة ٤٥٠ nm والذى يرجع إلى الكاروتينات ، يبخر المذيب نهائياً ثم يعاد ذوبان المادة الباقية residue فى كلوروفورم ، ويتم تفاعلها مع جوهر الـ TFA حيث يتكون لون أزرق يقاس على طول موجة ٦٢٠ nm .

الطريقة الأولى (Bradley and Harnbrck , 1973) : -

الجواهر الكشافة : -

١ - كحول إيثايل ٩٥٪ (AR) .

٢ - إيثير بترولى BP ٤٠ - ٦٠° م (AR) .

٣ - كلوروفورم لامائى (AR) .

٤ - جوهر TFA : - يخلط حجم من TFA (AR) مع حجمين من الكلوروفورم قبل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الاستعمال مباشرة ، وهذا الجوهر ثابت لمدة ٤ ساعات على ٢٥° م .

٥ – Retinol stock standard (١٦٠ ملجم / لتر) : – ينقل ١٨,٣٥ ملجم خلات ريتينيل all trans) retinyl acetate) إلى دورق معيارى سعة ١٠٠ مل ويذاب فى الكلوروفورم ويكمل إلى العلامة .

٦ – Retinol working standards : – يخفف ١٠,٠ مل من محلول الريتينول المركز (جوهر ٥) الى ١٠٠ مل بالكلوروفورم ، ثم يخفف ٢,٥ و ٥,٠ و ٧,٥ و ١٠,٠ مل من هذا المحلول الى ١٠٠ مل بالكلوروفورم ، فنحصل على محاليل قياسية مختلفة من الريتينول بتركيزات ٤,٠ و ٨,٠ و ١,٢٠ و ١,٦٠ ملجم / لتر ، على التوالى . وهذه المحاليل القياسية ثابتة لمدة أسبوع واحد على درجة حرارة ٤– ٨° م فى الظلام .

٧ – β – carotene stock standard (٢٠٠ ملجم / لتر) :– يذاب ٢٠,٠ ملجم بيتا كاروتين مخلق بللورى synthetic crystalline فى حوالى ٤ مل كلوروفورم ويكمل إلى ١٠٠ مل بالأيثير البترولى .

٨ – β – Caretene working standards : – يخفف ١٠,٠ مل من محلول البيتا كاروتين المركز (جوهر ٧) إلى ١٠٠ مل بالإيثير البترولى ، ثم يخفف ٢,٥ و ٥,٠ و ١٠,٠ و ١٥,٠و ٢٠,٠ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠مل بالأيثير البترولى، فنحصل على محاليل قياسية مختلفة من البيتاكاروتين بتركيزات ٠,٥ و ١,٠ و ٢,٠ و ٣,٠ و ٤,٠ ملجم / لتر ، على التوالى . وهذه المحاليل القياسية ثابتة فقط لساعات قليلة على درجة حراره ٢٥° م . ولابد من تحضيرها طازجة freshly عند كل تحليل .

التكنيك : –

لابد من تحضير كل المحاليل القياسية حين التقدير ، وتجرى كل العمليات التحليلية فى أدوات زجاجية (أنابيب) قليلة النفاذية للأشعاع (معتمة) low actinic glassware أو فى ضوء خافت subdued light ، كما ينجز كل تحليل أو قياس بصورة مزدوجة in duplicate .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١ - **تجميع العينات** : - تجمع عينات الدم من الحيوانات الصائمة (أو من الإنسان الصائم) ، ويجب أن تكون خالية من تحلل كرات الدم الحمراء haemolysis ، والمحافظة عليها من الضوء ووقايتها منه . ويمكن تخزين عينات السيرم المفصوله من الدم حديثة التحضير (الطازجة) على - ٢٠ ° م على الأقل لمدة أسبوعين فى الظلام .

٢ - **التحليل** :- يؤخذ ١,٠ مل من السيرم فى أنبوبه طرد مركزى زجاجية ذات غطاء زجاجى محكم سعة ١٥ مل ، ويضاف إليها ٢,٠ مل أيثانول ثم تغلق الأنبوبه بغطائها الزجاجى وتخلط محتوياتها جيداً بواسطة vortex mixer . بعد الخلط الجيد ، يضاف ٣,٠ مل أيثير بترولى ثم تغلق وتوضع فى هزاز shaker ميكانيكى لمدة ١٠ ق لتمام أستخلاص الريتينول والكاروتينات فى طبقة الأيثير البترولى . توضع الأنابيب فى جهاز الطرد المركزى ثم تطرد مركزياً لمدة ١٠ ق على ٢٥٠٠ g . بحذر ينقل بالضبط ٢,٠ مل من طبقة الأيثير البترولى العليا أو ٢,٠ مل من كل محلول .carotene working st إلى cuvette جافة (المسار الضوئى لها ١٠ مم) ثم يقاس الأمتصاص absorbance على طول موجة ٤٥٠ nm (A_{450}) ضد أيثير بترولى كبلانك blank . يتم أجراء ذلك بدون تأخير (بسرعة) حتى نتلافى تبخر المذيب وتلف الكاروتينويدات carotenoids بواسطة الضوء .

تبخر محتويات الـ cuvettes حتى تمام الجفاف فى حمام مائى على ٥٠° م بمعاونة تيار من النيتروجين (ويجفف كل منها بحذر) . تؤخذ الـ cuvettes ثم يضاف ١٠٠ µl كلوروفورم الى كل منها ثم تخلط جيداً وبسرعة بواسطة جهاز vortex mixer . تحضر أيضاً cuvettes تحتوى على ١٠٠ µl من كل محاليل .retinol working st . يضاف ١,٠مل جوهر TFA إلى cuvette البلانك التى تحتوى على ١٠٠ µl كلوروفورم ، ثم تخلط جيداً وتستخدم لضبط الأسبكتروفوتومتر على الصفر على طول موجه ٦٢٠ nm . يضاف بسرعة ١,٠ مل جوهر TFA لكل cuvette أخرى مع الخلط بسرعة ، ثم يقاس الأمتصاص على طول موجه ٦٢٠nm (A_{620}) بعد ثانيتين من أضافة الجوهر وتسجل القراءات .

كما هو معروف أن الـ TFA حامض قوى ذو بخار مثير أو مهيج irritant vapaur ، فلابد من الأحتياط والحزر عند التعامل معه لتفادى سكبه وطرطشته splashing . ونحصل على أحسن النتائج إذا أضيف جوهر الـ TFA بواسطة ماصة آلية automatic pipette متصلة بجهاز الأسبكتروفوتومتر .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الحساب : -

يحسب تركيز الكاروتين والريتينول فى السيرم بواسطة المعادلتين التاليتين : -

$$\text{Serum carotene}\,(mg/l) = \frac{A_{450}\ \text{of Unknown}}{A_{450}\ \text{of Standrd}} \times \text{Concentration of standaed} \times 3$$

$$\text{Serum retinol}\,(mg/1) = \frac{\acute{A}_{620}\ \text{of Unknown}}{\acute{A}_{620}\ \text{of standard}} \times \text{concentratian of standard} \times \frac{3}{2}$$

حيث أن : -

$$\acute{A}_{620} = A_{620} - (F \times A_{450})$$

وتقدر قيمة F كما يلى : -

قيمة F تختلف من معمل لآخر وعلى ذلك فلابد من تقديرها فى كل معمل ، ولتحديدها ، يعامل ٢,٠ مل من كل من . Carotene working st بنفس الطريقة التى عومل بها ٢,٠ مل من مستخلص الايثير البترولى (عينة السيرم) بالضبط ويقاس الامتصاص لها على طول موجة ٦٢٠ nm). (A_{620}) ثم تحسب قيمة F بقسمة A_{620} / A_{450} لكل working st. ويحسب المتوسط .

الطريقة الثانية (Neeld and Pearson , 1963)

لتقدير فيتامين أ والبيتاكاروتين فى السيرم ، لابد من جمع عينات الدم لأشخاص صائمين ولابد أن تكون العينات خالية من تحلل كرات الدم الحمراء haemolysis ويحافظ عليها من الضوء . وإذا لم تتاح الظروف للتقدير والعينات طازجة فيمكن حفظها على - ١٠° م، فيتامين أ يكون ثابتاً فى هذه الظروف على الأقل لمدة أسبوعين .

الجواهر الكشافة : -

تستخدم جميع الجواهر الكشافة كما ذكرت فى الطريقة السابقة .

التكنيك : -

١ - فى أنبوبة طرد مركزى بغطاء زجاجى سعة ١٥ مل يوضع ١,٠ مل من السيرم .

٢ - يضاف إليها ٢,٠ مل كحول الإيثايل (٩٥٪ حجم / حجم) ، وتغلق جيداً وتخلط

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

محتويات الأنبوبة جيداً وترج بواسطة vortex mixer

٣ – يضاف ٣,٠ مل إيثير بترولى ثم توضع الأنابيب مغلقة فى هزاز (جهاز رج) بحركة دائرية shaker in the round أو فى أى جهاز رج آخر مناسب لكى يتم استخلاص الكاروتينات وفيتامين أ فى طبقة الإيثير البترولى .

٤ – بعد تمام الاستخلاص ، يتم طرد الأنابيب مركزياً على ٢٥٠٠ rpm لمدة ١٠ ق .

٥ – بدقة شديدة وبحذر تسحب طبقة الإيثير البترولى (الطبقة العليا) وتنقل إلى خلية قياس جافة (مثل 10 × 75 Coleman cuvette) ثم يقاس الامتصاص على طول موجة ٤٥٠ nm فى جهاز سبكتروفوتومتر مناسب ضد الايثير البترولى كبلانك بدون أدنى تأخير لتلافى تبخير المذيب وتلف الكاروتينات بالضوء ، ولتكن A_1 هى مقدار الامتصاص .

٦ – تبخر محتويات خلايا القياس حتى الجفاف فى حمام مائى على ٥٠° م بمساعدة تيار دقيق من النتيروجين . وبعد ذلك تجفف كل خلية بدقة وحذر بواسطة ورق مانع للأحتكاك nonabrasive paper (لتلافى الخدش scratching أو احداثة) .

٧ – يضاف ٠,١ مل كلوروفورم لكل خلية قياس وتمزج جيداً بواسطة vortex mixer .

٨ – يضاف ١,٠ مل جوهر TFA لخلية قياس البلانك وتوضع فى جهاز الأسبكتروفوتومتر مضبوط على طول موجه ٦٢٠ nm ويضبط على صفر امتصاص .

٩ – يضاف ١,٠ مل جوهر TFA مرة واحدة وبقوه إلى خلايا القياس الأخرى (لتسهيل الخلط فى الحال) ، ثم يقاس الأمتصاص على نفس طول الموجه فى خلال ثانيتين بعد أضافة الجوهر وتسجل قيمة الأمتصاص .

تحذير: – TFA حمض قوى ولابد من مرعاه الدقة والحذر عند أستعماله .

أحسن نتائج يمكن الحصول عليها لو أضيف جوهر TFA دفعة واحده وبقوة forcefully بواسطة ماصه آليه . ولو أستعمل مسجل recorder ، فأنه يمكن قراءه قيمة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الامتصاص على الـ peak أو عند نقطة الأنثناء inflection point بعد بدايه ارتفاع الـ peak فجأه نتيجة اضافة الـ TFA . هذا الـ peak الثانى أو نقطة الأنثناء هذه تحدث بعد ثانيتين من أضافة جوهر اللون . هذا ولتكن قيمة القراءة هى A_2 .

الحساب : -

أ - **البيتاكاروتين** :- تقدر كمية البيتاكاروتين لكل مل من المنحنى القياسى للكاروتين وتجرى الحسابات التالية : -

$$\mu g\ \beta\text{-carotene} /100\ ml\ serum = \mu g\ \beta\text{-carotene} / ml \times 3.0 \times 100$$

حيث أن :

3.0 = حجم الإيثير البترولى الذى يحتوى على البيتاكاروتين من ١,٠ مل سيرم بعد الاستخلاص

100 = معامل التحويل من تركيز μg / ml الى μg /100 ml

ب - **فيتامين أ** : - لحساب محتوى فيتامين أ بدقة ، من الضرورى تصحيح الامتصاص الذى يرجع إلى وجود الكاروتينات على طول موجة ٦٢٠ nm .

$$A_3 = A_2 - (F \times A_1)$$

حيث أن : -

A_1 = امتصاص الكاروتين على طول موجة ٤٥٠ nm (الخطوة رقم ٥) .

A_2 = امتصاص الكاروتين وفيتامين أ على طول موجه ٦٢٠ nm (الخطوة رقم ٩) .

A_3 = أمتصاص فيتامين أ على طول موجة ٦٢٠ nm (تصحيح الامتصاص الراجع الى وجود الكاروتين) .

F = معامل ، يحول امتصاص الكاروتين على طول موجة ٤٥٠ nm (الخطوة ٥) إلى امتصاص مكافىء على طول موجة ٦٢٠ nm فى تفاعل اللون .

$$F = \frac{A_{620} \text{ of carotene using Vit.A procedure}}{A_{450} \text{ of petroleum ether solution of carotene}}$$

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وهناك اختلافات كثيرة فى قيمة هذا المعامل ، لذلك فيوصى بتقدير قيمتها فى كل معمل .

هذا ، وبعد إيجاد قيمة A_3 ، يمكن حساب التركيز الحقيقي لفيتامين أ لكل ١٠٠ مل سيرم من المعادلة التالية : -

$$\mu \text{ Vit . A (free alcohol) / 100 ml} = \frac{A_3 \times \text{mg retinyl acetate st . / cuvet}}{A_{620} \text{ retinyl acetate st .}} \times \frac{3}{2} \times 100 \times 0.872$$

or

$$\mu g \text{ Vit.A / 100 ml} = \frac{A_3 \times \mu g \text{ retinyl acetate st . / cuvet}}{A_{620} \text{ retinyl acetate st.}} \times 130.8$$

حيث أن : - 3 = حجم مستخلص الإيثير البترولى لكل ١,٠ مل سيرم .

2 = كمية مستخلص الإيثير البترولى المستخدمة للتقدير .

100 = تحويل µg خلات الريتينيل لكل مل إلى µg لكل ١٠٠ مل .

0.872 = نسبة الكتلة الجزيئية لخلات الريتينيل . وهذا العامل يصحح استخدام خلات الريتينيل بدلاً من الريتينول كمادة قياسية .

التعيير Calibration : -

١ - **البيتاكاروتين** : - توضع تركيزات معلومة من البيتاكاروتين القياسى working st. فى خلايا قياس مناسبة بحيث يتراوح تركيزها بين ٠,٥ إلى ٤,٠ µg / مل ، ثم يقاس الامتصاص لكل منها على طول موجة ٤٥٠ nm ضد الايثير البترولى كبلانك . توقع التركيزات (µg / m1) ضد الامتصاص ، وبذلك يكون هناك المنحنى القياسى .

لغرض حساب معامل تصحيح الكاروتين F لطريقة فيتامين أ ، تعامل ٢,٠ مل من كل البيتا كاروتين القياسية كأنها عينة بالضبط ، بداية من الخطوة رقم ٦ فى طريقة تقدير الفيتامين ، ثم يحسب بعد ذلك متوسط نسبة الامتصاص على طول موجة ٦٢٠ nm إلى تركيز البيتاكاروتين (µg / m l) وتستخدم فى حساب معامل تصحيح الكاروتين (F) .

٢ - **فيتامين أ** :- يؤخذ حجم مقداره ٠,١ مل من كل retinyl acetate working st. فى خلايا قياس ثم تعامل كما فى طريقة فيتامين أ ، وبعد ذلك يرسم المنحنى القياسى الخاص بـµg خلات الريتينيل لكل خلية ضد الامتصاص الخاص بها على طول موجة ٦٢٠ nm.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المستويات الطبيعية Normal values : -

المدى الطبيعى لفيتامين أ فى السيرم يكون بين ٢٠ و ٦٥ µg لكل ١٠٠ مل ، والقيم التى أزيد من ١٠٠ µg لكل ١٠٠ مل ربما توجد فى المرضى بتسمم فيتامين أ Vit. A toxicity .

المدى الطبيعى للكاروتينات (أساساً كبيتاكاروتين وزانثوفيل xanthophyll) يكون بين ٦٠ و ٢٠٠ µg لكل ١٠٠ مل سيرم . المستويات العالية من الكاروتين فى السيرم كثيراً ما تلاحظ فى الأطفال الرضع وفى حالات hypothyroid وهى نتيجة لعدم قدرة الكبد على تحويل الكاروتينات إلى فيتامين أ . كما أن هناك حالات أخرى وهى زيادة المأخوذ منها مع الغذاء عن الحد اللازم (زيادة مفرطة)، وفى حالات زيادة ليبيدات الدم hyperlipemia المرتبطة بمرض السكر diabetes mellitus .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فيتامين د – Vitamin D

D_2 ; R =

D_3 ; R =

تشمل مجموعة فيتامين د مجموعة كبيرة من الفيتامينات تعطى أرقام من ٢ إلى ٧ وكل هذه المجموعة لها بادئات ذات تركيب أستيرويدى ، وبتشعيع هذه البادئات تتحول إلى فيتامين د . وشكل (٢٣) يعرض العلاقة التركيبية بين نواة الأسيترويد وفيتامين د٣ ، كما يعرض السلاسل الجانبية لبادئات مجموعة فيتامين د والفيتامينات الناتجة منها بعد التشعيع .

وتتميز هذه البادئات بتحولها إلى فيتامينات بالتشعيع ، وهناك مسارات كيميائية ضوئية عديدة تسلكها هذه البادئات وشكل (٢٤) يعرض هذه المسارات .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

https://scholar.google.com/citations?user=t1aAacgAAAAJ&hl=en

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.facebook.com/groups//Biothesis

https://www.researchgate.net/profile//Salam_Ewaid

07807137614



Structural relationship of the parent steroid nucleus cyclopentanoperhydrophenanthrene (A) to vitamin D_3 (B). The lettering of the four rings and the numbering of the carbon positions are in accordance with the standard IUPAC system for steroids.

Side Chains of Provitamin D[a]

Provitamin trivial name	Vitamin D produced upon irradiation	Empirical formula (complete steroid)	Side-chain structure
Ergosterol	D_2	$C_{28}H_{44}O$	
7-Dehydrocholesterol	D_3	$C_{27}H_{44}O$	
22,23-Dihydroergosterol	D_4	$C_{28}H_{46}O$	
7-Dehydrositosterol	D_5	$C_{29}H_{48}O$	
7-Dehydrostigmasterol	D_6	$C_{29}H_{46}O$	
7-Dehydrocampesterol	D_7	$C_{28}H_{46}O$	

[a]Note that 22, 23-dihydroergosterol and 7-dehydrocampesterol are epimers at C-24.

شكل (٢٢) العلاقة التركيبية بين نواة الأسيترويد وفيتامين د ، والسلاسل

الجانبيـة لبادئات فيتامين د ومجموعة فيتامين د الناتجة بعد تشعيعها

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

شكل (٢٤) المسار الكيميائى الضوئى لتحول البروفيتامين إلى فيتامين د

تفاعلاته : -

مجموعة فيتامين د ثابتة للمعاملات التالية : -

الأختزال :- reduction والحرارة والحامض والقلوى ، ولكنها غير ثابتة تحت ظروف الأكسدة oxidation والضوء .

الذوبان : - يذوب فى المذيبات العضوية مثل الأسيتون و الكلوروفورم والأيثانول والبنزين (مذيبات الليبيدات) ، ولا يذوب فى الماء.

صورته : - يوجد فى صورة أسترات (أستر بالميتات palmitate) ، و صورتة البللورية على شكل أبر دقيقة لا لون لها ولا رائحة ، و أقصى أمتصاص له (د٢ ، د٣) على طول موجه ٢٦٥ nm ، ودرجة أنصارها ١١٦° م و ٨٣° م على التوالى .

انتشاره ومصادره : -

١ - **وجوده فى النباتات** : - لا يوجد الفواكه ويوجد فى زيوت الحبوب

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

والخضروات فى صورة بروفيتامين ، كما أنه لا يوجد فى النقل .

٢ - **وجوده فى الحيوانات** :- يوجد فى التونا tuna وفى زيت كبد الحوت وصفار البيض وفى اللبن المعامل بالاشعاع (UV) ، وفى العظام وأمعاء الحيوانات intestine والمخ brain والطحال spleen والكبد والدم ، كما يوجد فى بعض أنواع السمك وبعض أنواع المحار mollusks .

٣ - **وجوده فى الكائنات الحية الدقيقة** :- يوجد فى كل من الخميرة yeast والطحالب وبعض البكتريا فى صورة بروفيتامين .

المصادر الغذائية : -

١ - **المصادر الغنية** :- يتراوح تركيزه فيها من ١٠٠٠ إلى ٢٥ × ١٠^٦ وحدة دولية لكل ١٠٠ جم ، مثل زيت السمك والتونا و الحوت وbonito sea bas .

٢ - **المصادر المتوسطة** :- يتراوح تركيزه فيها من ١٠٠ الى ١٠٠٠ وحدة دولية لكل ١٠٠ جم ، كما فى صفار البيض و المارجرين و الشحوم الحيوانية lard والسالمون salmon والماكريل mackerel و الرنجة herring والسردين sardine .

٣ - **المصادر القليلة** : يتراوح تركيزه فيها من ١٠ - ١٠٠ وحدة دولية لكل ١٠٠ جم ، مثل زيوت الحبوب والخضراوات وبطارخ الحوت cod roe والزبد butter و الكريمة cream و البيض والجبن cheess واللبن و الكبد (بقر - خنزير - عجول - حملان) و لحم الحصان horse meat واللحم البقرى beef و لحم العجول veal .

الدور الطبى والغذائى : -

١ - **وحدات فيتامين د٣** : - وحدة دولية واحدة (IU) = ٠,٠٢٥ ميكروجرام µg

و حده دولية واحده (IU) = 1 USP

٢ - المستويات الطبيعية فى الدم : -

يبلغ تركيزه فى السيرم ٢,٧٥ ميكروجرام / ١٠٠ مل سيرم ، أو ما يعادل ٦٦ - ١٦٥

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وحده دولية / ١٠٠ مل سيرم .

٣ - المقرارات الموصى بها : -

للأطفال : - ٤٠٠ وحده دولية لكل يوم .

للبالغين فى المناطق الاستوائية : - متاح فى الغذاء الطبيعى لهم .

للبالغين فى المناطق المعتدلة temperate : - ٤٠٠ وحدة دولية / يوم .

للحالات الخاصة : الحوامل والمرضعات : - ٤٠٠ وحدة دولية / يوم .

٤ - اعطاء فيتامين د : -

يمكن اعطاءه بعدة طرق هى : -

أ - **الحقن** Injection : - إما تحت الجلد Subcutoneous (s.c) أو فى الغشاء البريتونى (I.P) ، أو فى العضلات (I . M) ، ويعطى فى صورة استرات .

ب - **موضعياً** Topical : - يعطى فى صورة دهان حيث يمكن امتصاصه من خلال الجلد .

حـ - **عن طريق الفم** Oral : - يعطى فى صورة كبسولات أو أقراص ، وتلك هى أفضل طريقة .

٥ - أعراض النقص : - فى حيوانات التجارب والإنسان :

١ - تأخير النمو وكساح rickets .

٢ - سوء تكوين العظام bone malformation خصوصاً الأسنان .

٣ - سوء تكوين الجهاز العظمى skelatal malformation .

٤ - قلة الكالسيوم والفوسفور الدم .

٥ - زيادة نشاط أنزيم alkaline phosphatase (A p) فى الدم .

٦ - قلة العناصر فى العظم bone demineralization .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٦ - أمراض النقص : -

١) الكساح rickets : -

يعتبر الكساح مرض من امراض سوء التغذية وعاده ما يصيب الاطفال في السنة الأولى والثانية بعد الولاده خصوصاً للاطفال التي لا تعرض لاشعة الشمس .

وأعراضة : - تقوس عظام الساقين وأعراض أخرى مثل فقر الدم والأرتخاء ، ومن اهم أسباب ظهوره نقص فيتامين د في الجسم وذلك قد يرجع الى : -

أ - الرضاعة الأصطناعية .

ب - قله التعرض لأشعة الشمس أو عدمه .

حـ - فساد نظام الطفل الغذائي .

د - التسم المزمن ، وذلك بتناول الأدوية السامة مده طويلة من الزمن .

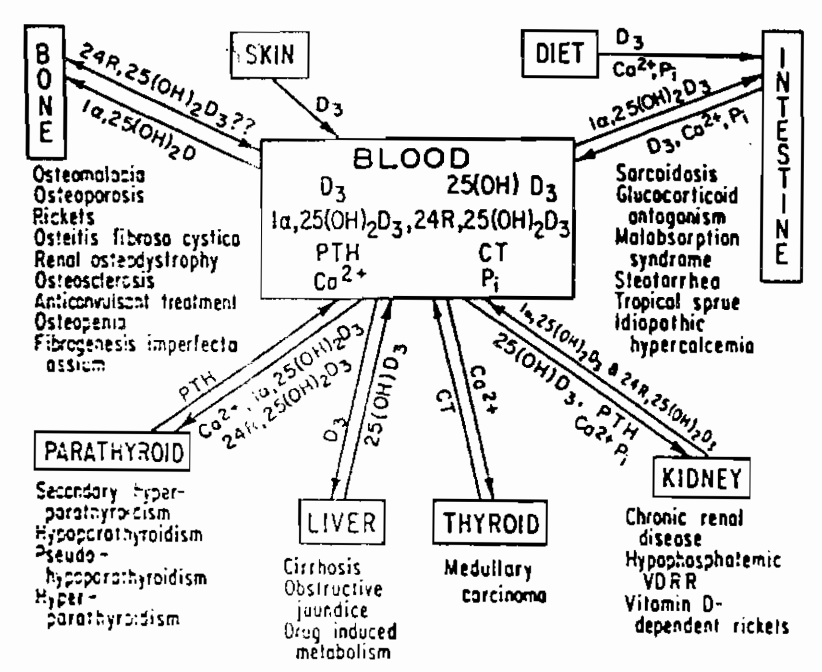
٢) مرض لين العظام عند البالغين osteomalacia.

٣) إلتهاب اللثة ونزفها .

٤) امراض أخرى .

أثبت العلم الحديث إن فيتامين د له صلة وثيقة بكثير من اعضاء الجسم مثل الامعاء الدقيقة والكلى و الكبد والعظام ، كما أنه على علاقة بالغده الدرقية وبالغده الجاردرقيه . وبذلك فإن هناك حالات مرضية كثيرة في الإنسان ترتبط بفيتامين د . وشكل (٢٥) يلخص الحالات المرضية في الإنسان وعلاقتها بفيتامين د .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



شكل (٢٥) الحالات المرضية فى الإنسان التى على صلة بفيتامين د

٧ – معاملة حالات نقص فيتامين د : –

بالنسبة للأطفال الرضع infants المصـابة بنقص فـيتـامين د تعطى ١٥٠٠ – ٢٥٠٠ وحدة USP من الفيتـامين يومياً لمده عدة شهـور ، وتتضـاعف double هذه الجرعة بالنسبة للأطفال قبل سن البلوغ premature infants .

٨ – مصادره للأجناس التى تحتاج إليه : –

كل الفقاريات تحتاج إليه (يعتبر فيتامين بالنسبة لها) .

أ – **المصـادر الخـارجيـة** : تحتـاج إليه أطفـال الفقـاريات الرضع من المصـادر الخارجية ، وأيضاً تحتاجه الفقاريات البالغة من المصادر الخارجية .

ب – **المصـادر الداخليـة** : يمكن للفقاريات الاستفادة من مصـادر البروفيتـامين الداخلية التى بها عن طريق التعرض لأشعة UV .

٩ – تأثير الجرعات العالية من الفيتامين على الإنسان : –

إذا تناول الإنسـان حـوالى ٤٠٠٠ وحـدة دولية / يوم أو أكثـر فـإنها تسبب الأعـراض

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التالية : اسهال diarrhea ، والتبول بكثرة poly uria ، و ضعف العضلات muscular weakness ، وآلام فى المفاصل joint pains ، وزيادة الكالسيوم فى السيرم ، و تكلس calcification الأنسجة الرخوة (شرايين arteries وعضلات)، و تلف شريانى arterial lesions ، وضرر كلوى Kideny injury ، و anorexia ، و thirst ، و nausea .

فصل وتقدير فيتامين د

أ - الاستخلاص : -

يعتبر فيتامين د أكثر ثباتاً للاكسدة من فيتامين أ، لذلك فإن عملية فقده أثناء الاستخلاص أقل . وأحسن طريقة للاستخلاص هى اجراء التصبن بأيدروكسيد بوتاسيوم كحولى ثم يليه استخلاص إيثيرى للمواد الغير متصبنة . ويمكن إضافة حمض الأسكوربيك كمادة مضادة للاكسدة كما سبق . وعند تحليل فيتامين د فى الأغذية يكون من المناسب أستخلاص من ٥٠ - ١٠٠ جم من المادة تحت التحليل وذلك لقلة مستويات فيتامين د فيها . وأسهل طريقة لحل هذه المشكلة (كبر المادة المحللة نسبياً) ، هى استخلاص الدهون من العينة قبل التصبن ، فيما عدا إذا عرف مسبقاً وجود إستركبريتات الكولكالسيفيرول cholecalciferol sulphate ester الذائب فى الماء كما فى لبن الإنسان والبقرة ، فلابد من أخذ الاحتياط اللازم عند أجراء pre - extraction للدهن .

ب - الفصل والقياس : -

الطرق الطبيعية - الكيميائية physico - chemical methods المختارة والمتاحة لتقديره هى القياسات اللونية والفلورمترية وفى الـ UV والطرق الكروماتوجرافية المختلفة (GC - TLC - HPLC - الأعمدة) . والقياس اللونى ليس دقيقاً نظراً لافتقاده للدقة والتخصص خصوصاً فى عدم مقدرة هذا القياس فى التمييز بين الكولكالسيفيرول والأرجوكالسيفيرول . فى بعض الأغذية ذات مستويات كولكالسيفيرول منخفضة جداً (أقل من ١ ميكروجرام / ١٠٠ جم) مثل الزبد والجبن واللبن ، وجد أن أحسن طريقة متاحة هى الطرق الحيوية باستخدام الحيوانات . وعموماً ففى الطرق الطبيعية - الكيميائية السابقة من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الضرورى اجراء تنقية مبدئية للمستخلصات ، وعاده ما تكون بواسطة الفصل الكروماتوجرافى . chromatographic separation

وحيث أن فيتامين د يعتبر كأسيترويد steroid ، فإنه من الأفضل استخلاصه من الأنسجة بطرق استخلاص الليبيدات الكلية (كلوروفورم : ميثانول = ٢ : ١) وبعد استخلاصه يمكن فصله هو ونواتج تمثيله metabolites باستعمال الطرق الكروماتوجرافية المختلفة . والفصل بطرق الكروماتوجرافى الورقى يتطلب وقتاً طويلاً ويعطى فصلاً غير واضحاً . مع إن الـ GC مفيد فى هذا الفصل إلا أنه يعطى تشابه حرارى thermal isomerization حيث يتحول فيتامين د إلى بيروكالسيفيرول pyrocalciferol وأيزوبيروكالسيفيرول isopyrocalciferol ، لذلك يفضل عنه الفصل بالأعمدة الكروماتوجرافية . ويمكن استخدام السيليكاجيل أو الالومينا أو floridin أو celite او سيفادكس LH - 20 كمواد دعامية supports . وأحسنها هو السيفادكس لأنه يعطى فصل جيد خصوصاً لنواتج تمثيله فى وقت سريع . وقد طبق الآن حديثاً الـ HPLC وقد كان أسرعها وأعطى نتائج جيدة .

وتفتقر الطرق الطبيعية أو الكيميائية إلى الحساسية مقارنة بالطرق الحيويه لذلك فالطرق الطبيعية – الكيميائية غير مناسبة لتقدير فيتامين د فى مصادره الفقيرة ، ولكن أفضليتها تكون فى العينات ذات المستوى العالى من الفيتامين لقلة الوقت الذى تستهلكه .

١- الأمتصاص فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية UV absorpion : -

أول التكنيكات المتاحة للتقدير الكمى لفيتامين د تعتمد على قياس الامتصاص فى الـ UV على طول موجة ٢٦٤ nm . فيستجيب نظام الروابط الزوجية الثلاث المتبادلة triene فى أستيرويدات فيتامين د لطيف الـ UV ، حيث يحدث أقصى امتصاص لها عند طول موجة nm٢٦٤ . وعلى ذلك يمكن حساب تركيز فيتامين د فى محلوله من هذه الخاصية ، وذلك فى وجود محلول قياسى له . ومع أن هذا التكنيك يتمتع بالسهولة والسرعة إلا أن أهم عيوبة أنه يجب أن تكون العينة نقية تماماً من أى مواد متداخلة لها امتصاص على طول موجه nm٢٦٤.

٢ - الطرق اللونية : -

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تم اكتشاف عدة طرق لونية للتقدير الكمى لفيتامين د منذ سنوات عديدة . وهى تعتمد على عملية تشابه isomerization لفيتامين د إلى أيزوتاكيستيرول isotachysterol . وهذه الطرق تستعمل ثالث كلوريد الأنتيمون ، والذى يمكنه الكشف عن فيتامين د بمدى يتراوح من ١ إلى ١٠٠٠ ميكروجرام . وحيث أنه يمكنه الكشف عن تركيزات عالية من الفيتامين ، فإن هذا التقدير يستخدم مبدئياً لتقدير محتوى فيتامين د فى المستحضرات الطبية . وأصبحت هذه الطريقة الرسمية (official USP) لتقدير فيتامين د٣ . وفى هذا التقدير يتم تحضير أربعة أنابيب أختبار ،الأولى تحتوى على فيتامين د قياسى ، والثانية تحتوى على العينة المجهولة مضافاً إليهما جوهر اظهار اللون color reagent ، والثالثة تحتوى على المذيب فقط وكلوريد الايثيلين ethylene chlororide مضافاً إليها جوهر اظهار اللون ، والرابعة تحتوى على كلوريد الايثيلين وأندريد خليك وجوهر اظهار اللون ، ويقاس الامتصاص على طول موجة ٥٠٠ nm بعد ٤٥ ثانية من اضافة الجوهر . ويتناسب تركيز الفيتامين مع امتصاصه والذى يتم تعديله ببلانك المذيب وبالأنبوبة التى تحتوى على أندريد حمض الخليك . والطريقة تتبع قانون بيير Beer's low إذا احتوت المحاليل على ٥٠ - ١٠٠ وحدة دولية من الفيتامين لكل مل من المحلول ، والتى غالباً توجد فى العينات الطبية . أما فى المستحضرات الأخرى ، فيلزم عملية تنقيه اما بكروماتوجرافى الادمصاص أو التوزيع ، وبذلك تستهلك وقت أطول .

وقد قام Nield بتعديل جوهر كار - بريس المستخدم فى تقدير فيتامين أ وذلك بأضافة كلوريد الأسيتيل acetyl chloride إلى ثالث كلوريد الأنتيمون المذاب فى 1, 2 dichloroethane مباشرة قبل الاستعمال . فيظهر معقد ملون بلون وردى pink سرعان ما يختفى مع فيتامين د ذات أقصى امتصاص على طول موجه ٥٠٠ nm بدون امتصاص على الموجتين السابقتين . ويثبط اللون بأضافة أندريد حمض الخليك . ومشكلة هذه الطريقة هى عدم تمييزها بين الأرجوكالسيفيرول والكولكالسيفيول .

وحيث أن هذا الجوهر غير متخصص ، فأنه من الضرورى التخلص من الاستيرولات sterols والكاروتينويدات وفيتامين أ قبل التقدير . وفى طريقة تقدير فيتامين د فى اللبن ، يتم اجراء عملية التصبن مرتين ثم يليهما ترسيب بالاستيرولات بالـ digitonin ثم يمرر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المستخلص بعد ذلك على عمود كروماتوجرافى يحتوى على celit - poly-ethylene أو الومينا قاعدية غير نشطة بـ ٨٪ ماء، ثم تتم عملية الاحلال بـ (isooctane)2,2,4- triethylpropane هذا وحساسية هذه الطريقة حوالى ٢,٠ ميكروجرام . .

٣ – طرق الفلورة : –

يتم تقدير الفيتامين على أساس تفاعله مع جوهر معين فينتج مركب له خاصية الفلورة . وتعتمد هذه الطرق على حقيقة ، وهى أن محلول أنדريد حمض الخليك – حمض الكبريتيك الذى يحتوى على فيتامين د قادر على الفلورة إذا نشط المحلول بضوء ذات طول موجة معينة بالضبط . وكما فى الطرق اللونية فإنه تتداخل مجموعة من المركبات ذات التركيب المشابه للفيتامين فى خاصية الفلورة . وهذه الطرق عادة لا تستخدم فى تقدير تركيز فيتامين د فى مستحضراته .

٤ – الكروماتوجرافى الغازى (GC) : –

يفضل الـ GC فى فصل وتقدير فيتامين د ومشابهاته عن الطرق اللونية لتقدير د٢ ، د٣ ، فلو حقن د٢ و د٣ فى جهاز GC ، فإن درجة الحرارة اللازمة لتطايرهما تكون أكبرمن ٢٠٠ °م، ويحدث لهما تحلق تركيبى بالحرارة thermal cyclisation وتعطى كروماتوجرام ذو two peaks لكل فيتامين (4 peaks)، وهما للمشابهات البيرو pyro والأيزوبيرو isopyro لكل من د٢ و د٣ . وتستخدم هذه المشابهات الحرارية فى تقدير فيتامين د كمياً . أما الأيزوتاكيستيرول isotaachysterol فلا يتحلق not cyclise ويعطى peak واحد . ويحدث لفيتامين د عملية تكوين مشابهات أخرى مع ثالث كلوريد الأنتيمون فى الكلوروفورم أو مع حمض الأرثوفوسفوريك ortho phosphoric acid فى حمض خليك أو مع ثالث فلوريد الخليك TFA ، ويتحسن الكروماتوجرام (الفصل يكون أحسن) لو تحولت مجاميع الهيدروكسيل فى الفيتامين ومشتقاته إلى إيثيرات السيليل silyl ethers ويتم تكوين مشتق أيثير ثلاثى ميثايل السيليل (TMS) trimethyl silyl بالتفاعل مع N.O.bis- (trimethylsilyl) acetamide. ومن ميزة هذه الطريقة أنه يمكن استعمال إى صورة للفيتامين كمرجع داخلى internal

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

standard بشرط عدم وجودها فى العينة تحت الدراسة .

وكما هو متبع فى الطرق اللونية ، لابد من تنقية مستخلص العينة قبل الحقن فى الـ GC ، ويمكن أستخدام الـ TLC – سيليكاجيل كفصل مبدئى قبل الـ GC .

٥ – GC - Mass Spectrometry "GC - MS" : –

وهذا تكنيك حديث أعطى نتائج جيده . وتم تطبيقة بنجاح على عينات تحتوى على أستيرويدات . وفى التكنيك يتصل الـ MS بالـ GC ، وبجهاز كمبيوتر يحتوى على كل المعلومات الخاصة بأجزاء الأستيرويلات عند تكسيرها (fragments) . فبعد فصل الفيتامين ومشتقاته بالـ GC يتم تحليل كل منهما بالـ MS وتحلل الناتج فى الكمبيوتر . هذا ومازال هذا التكنيك فى مراحل التطور الأولى .

٦ – HPLC : –

أستخدم هذا التكنيك فى التحليل الكمى والوصفى لفيتامين د ونواتج تمثيله المختلفة ، ويستخدم فيها كواشف UV فى الكشف عن النواتج المفصوله ، وكانت حساسيتها ٥ نانوجرام ng. ومن أهم مميزاتها قله الجهد والوقت اللازمين للتحليل . ففى طريقة الـ USP الرسمية لتقدير فيتامين د يلزم لها خطوتين للتنقيه يأخذا أكثر من ٨ ساعات قبل التحليل اللونى ، أما هذا التكنيك فيحتاج إلى أقل من ساعة هذا بالأضافة إلى كفاءة وفاعلية وحساسية التقدير.

٧ – التقديرات الحيوية Biological assay : –

بأستثناء فيتامين ب ١٢ (Vit . B_{12})، يعتبر فيتامين د هو أكبر الفيتامينات فاعلية (كتعريف بكميه الفيتامين اللازمة لأظهار أستجابه حيوية) . وعلى ذلك فإن العينات البيولوجية والأنسجه الحيوانية عاده ما تحتوى على تركيزات صغيرة جداً من فيتامين د . فمثلاً مستوى فيتامين د٣ فى بلازما دم الإنسان فقط١٠–٢٠ نانوجرام/ مل أو ٢–٥ x ١٠^-٨ M وحتى يمكن تقدير هذا التركيز المنخفض جداً فلابد من وجود طريقة حساسه ومتخصصة للتقدير .

ومن أهم الطرق المستخدمة فى هذا المجال ما يلى : –

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١) Rat Line Test : -

من عام ١٩٢٢ إلى ١٩٥٨ استخدمت هذه الطريقة كطريقة رسمية فى تقدير فيتامين د فى المستحضرات الطبية والأغذية . وهذه الطريقة قادرة على الكشف عن ١ - ١٢ وحدة دولية (٢٥ - ٣٠٠ نانوجرام) من فيتامين د ، ومازالت تستخدم حتى الآن فى تقديره فى عديد من الأغذية خصوصاً اللبن . وهذه الطريقة تستخدم فئران مفطومة حديثاً و كسيحة recently weaned rachitic rats ، وتغذى هذه الفئران على عليقة مسببه للكساح rachitogenic diet (ناقصة فيتامين د) لمدة ١٩ - ٢٥ يوم حتى يظهر كساح حاد severe . ثم تقسم الفئران إلى مجاميع كل منها يحتوى على ٧ - ١٠ حيوانات و تغذى على علائق مدعمة بتركيزات متدرجة من الفيتامين (graded series) حيث تعتبر كمجموعته قياسية . وتغذى مجموعة أخرى على العينة المجهولة المختبرة . ويتم المحافظة على التغذية على هذه العلائق لمده ٧ أيام ، ثم تشرح dissect radii ، وتنظف عظام الزند ulnae من الأنسجة اللاصقة بها ، وتقطع لشرائح slice بالطول وتوضع فى محلول نترات فضة حيث يتم ترسيب deposition الفضة فى مناطق العظام المتكونه حديثاً بتأثير المعاملة بفيتامين د . ففى مكان ترسيب الكالسيوم الجديد ، تبدو هذه المناطق سوداء عند تعريضها للضوء . وبذلك يمكن تقدير تأثير العينة المجهولة على ترسيب الكالسيوم فى العظام بالمقارنة المرئية فى وجود المعاملات القياسية .

٢) AOAC chick assay : -

وحيث أن rat line test يتم فى الفئران . فهو لا يميز بين فيتامين د٢ و د٣ . وحتى يمكن قياس فيتامين د٣ فإنها تتم على كتاكيت chicks . ففى الكتاكيت يكون جهد(فاعلية) فيتامين د ٣ أكبر ١٠مرات من فيتامين د٢ ، وهذا التقدير يعرف بأسم AOAC chick assay ، وهو اساس للتقدير الدقيق لمستوى فيتامين د٣ فى مغذيات الدواجن poultry feed . ويتم هذا التقدير بتغذية مجاميع من كتاكيت حديثة الفقسnewly hatched كل منها ٢٠ كتكوت وتغذى على عليقة ناقصة فى فيتامين د Vit .D deficient diet ، ثم تمد كل مجموعة بكميات معلومة ومختلفة من فيتامين د إما عن طريق الفم orally أو من خلال الوجبة dietarily وبكميات تتراوح من ١ الى ١٠ وحدات دولية (٢٥ - ٢٥٠ نانوجرام) ، أو تمد بالمادة المختبرة فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

العينة . ثم تستمر هذه المعاملة لمدة ٣ أسابيع بعدها تذبح الحيوانات وتقدر النسبة المئوية للرماد فى عظام bone ash الساق الأكبرtibiae لها . فعظام الطائر المصاب بكساح عادة ما يحتوى على ٢٥ - ٢٧ ٪ رماد بينما الطيور المدعمة بفيتامين د ذات ٤٠ - ٤٥ ٪ رماد ، ولا تستعمل هذه الطريقة كثيراً لأنها تستهلك وقتاً طويلاً ومكلفه .

٣) أمتصاص الكالسيوم من الأمعاء Intestial calcium absorption :-

أستخدمت طرق حيوية أخرى على أساس قدرة فيتامين د على حث stimulate امتصاص الكالسيوم عبر الأمعاء الدقيقة . ففى هذه الطريقة أستغلت تلك الظاهرة ، وفيها يتم قياس تأثير الماده المختبرة على الكالسيوم المعوى المأخوذ intistinal Ca uptake فى تجارب تتم داخل الكائن الحى in vivo ، وفى بعض الطرق الأخرى كانت خارجه in vitro . وكل منهما له القدرة على كشف كميات فسيولوجية مثل ٢ - ٥٠ وحدة دولية (٥٠ - ١٢٥٠ ناتوجرام أو ١٣ , ٠ - ٢ , ٣ نانومول n mol) من فيتامين د . ويمكن توضيح فكرة عن هذه الطرق كما يلى :-

أ) التقدير داخل الكائن الحى In vivo technique : -

وفى هذا التكنيك تستعمل كتاكيت كسيحة مرباة على عليقة بها كالسيوم قليل (٦ , ٠ ٪) ومسببة للكساح لمدة ٣ أسابيع ، ثم تعطى الطيور جرعة واحدة من المركب المختبر إما عن طريق الفم أو فى الغشاء البريتونى I.P أو فى داخل القلب intracardially . تخدر الطيور بعد ٤٨ ساعة من الحقن anesthetize ، ثم يعمل بها جرح صغير incision على البطن abdomen ويخرج من الجرح الأثنى عشر duodenal loop ويحقن بـ ٢ , ٠ مل من محلول يحتوى على ٤,٠ ملجم آيون كالسيوم $^{40}Ca^{++}$ وحوالى ٦ × ١٠ ^٦ DPM من كالسيوم مشع $^{45}Ca^{++}$. ثم يعاد الأثنى عشرمرة أخرى إلى التجويف البريتونى peritoneal cavity وتقفل الفتحة بمشبك جروح wound clip ، ثم تذبح الكتاكيت بعد ٣٠ ق بفصل رأسها عن الجسم decapitation ويجمع دمها ويفصل منه السيرم ويؤخذ منه جزء صغير ليقدر فيه $^{45}Ca^{++}$ إما بعداد جايجر thin windo gas flow Geiger - Muller Counter أو بواسطة Liquid Sctillation Counter

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ب) التقدير خارج الكائن الحى In vitro technique : -

ويجرى التقدير خارج الكائن الحى بتقييم نشاط فيتامين د فى حثه على نقل الكالسيوم فى الأمعاء الدقيقة . وفى هذه التكنيكات يتم قلب عقد معوية intestinal loops وتحقن تحت ظروف in vitro بواسطة محلول كالسيوم مشع $^{45}Ca^{++}$. والتقدير يعتمد على حقيقة وهى أن السطح الميكوزى mucosal surface للنسيج سوف ينقل نشاط الكالسيوم خلال النسيج إلى الجانب المصلى الممزلق serosal side للأمعاء . وبقياس نسبة الكالسيوم المشع radioactive على جانبى الأمعاء (المخاطى والمصلى) بعد التحضين يعطى قياس قدرة الأمعاء intestine's ability على امتصاص الكالسيوم ، ومنها يمكن ايجاد كميه نشاط فيتامين د . وفى هذا التقدير يعطى كل من الفيتامين القياسى والمختبر عن طريق الفم أو فى الغشاء البريتونى قبل التقدير بمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، ثم بعد ذلك تقتل الحيوانات ويؤخذ منها طول قدره ١٠ سم من الأثنى عشر duodenum وتقلب ثم يربط طرفيها ، وبذلك تصبح فى صورة كيس معوى gut sac ذو سطح ميكوزى من الخارج outside وسطح مصلى من الداخل inside . ويملء الفراغ الداخلى لهذه الأكياس بواسطة ٠,٤ – ٠,٦ مل من بيئة تحصين تحتوى على $^{45}Ca^{++}$ ثم تحضن فى دورق يحتوى على ٢ – ٥ مل من بيئة $^{45}Ca^{++}$ لمدة ٢ – ٣ ساعة . تؤخذ أجزاء من كل وسط (الخارجى والداخلى) ويقدر فى كل منها النشاط الاشعاعى . ويعبر عن النتائج بنسبة الكالسيوم المشع فى كل منهما، ففى الحيوانات المصابة بنقص فى فيتامين د تكون هذه النسبة ١ – ٢,٥ بينما فى الحيوان الذى أخذ فيتامين د تكون عالية فهى تتراوح بين ٦ – ٧. وحيث أن طبيعة هذا التقدير مملة ، فعادة ما يفضل التقدير داخل الكتاكيت chick in vivo . وهذا التكنيك (in vivo) يستخدم بكثرة فى الدراسات على الثدييات mammals عما فى الطيور .

٤) ذوبان كالسيوم العظام Bone calcium mobilization : -

قياس آخر لنشاط فيتامين د غالباً ما يستعمل مقترناً مع بقياس امتصاص الكالسيوم فى أمعاء الكتاكيت ، وهو قياس ارتفاع الكالسيوم بالزيادة المتوسطة لفيتامين د . ويستخدم فى هذا التقدير كتاكيت كسيحة عمر ٣ أسابيع مغذاة على عليقة خالية من الكالسيوم لمدة٣

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أيام على الأقل قبل التقدير . وتلك الحالة تظهر مستويات منخفضة لكالسيوم السيرم (عادة ٤,٥ – ٥,٠ ملجم لكل ١٠٠ مل سيرم) . فلو أخذت هذه الطيور فيتامين د ، تحدث زيادة عالية لمستويات كالسيوم السيرم خلال ٢٤ – ٤٨ ساعة ، وهذه الزيادة تتناسب طردياً مع جرعة فيتامين د المعطاة ، وحيث أنه لا يوجد كالسيوم غذائى متاح (ميسر)، فيكون المصدر الوحيد للكالسيوم اللازم لزيادة فى السيرم هو العظم . وباستخدام هذا التقدير مع تقدير أمتصاص الكالسيوم من الأمعاء يمكن قياس وجهين مختلفين معاً لأستجابة الحيوان لفيتامين د .

٥) معدل النمو Growth rate : –

استجابة أخرى لفيتامين د وهى زيادة معدل النمو استجابة لأعطاء فيتامين د . وفى هذا القياس تربى كتاكيت عمر يوم واحد على عليقة مسببة للكساح ثم تعطى كميات قياسية من فيتامين د٣ أو المركب المختبر ثلاث مرات يومياً . ويتم جدولة وزن الطيور ، وترسم علاقة الوزن مع العمر .

ففى حالة غياب فيتامين د من الضرورى أن يستقر معدل النمو حتى الأسبوع الرابع . بينما ٥٠ وحدة دولية من فيتامين د لكل أسبوع تكون كافية للمحافظة على أقصى معدل maximal rate لنمو الكتاكيت . عائق هذه الطريقة هو المدة الطويلة لحد ما (٣ – ٤ أسابيع)، واللازمة للتقدير الدقيق لمعدل النمو .

٦) التقدير المناعي للـ CaBP : –

وهذا يشمل ثلاث أنواع من الطرق المناعية لتقدير CaBP وهى : –

a - Radial Immunoassay .

b - Radioimmunoassay (RIA) .

c- Enzyme - Linked Immunosorbant Assay (ELISA) .

فهذه الطرق هى أحدث الطرق البيولوجية ، حيث تستعمل وجود بروتين ربط الكالسيوم Ca - Binding Protein (CaBP) كدلالة لنشاط فيتامين د . فهذا البروتين الذى يعتمد على فيتامين د لايوجد فى أمعاء الكتاكيت المصابة بنقص فيتامين د ويخلق فى الأمعاء استجابة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لاعطاء فيتامين د. فالتكنيك الأول (a) قادر على كشف كميات ميكروجرامات من CaBP . أما تكنيك كل من ELISA , RIA فكلاهما قادر على كشف كميات نانوجرامات من CaBP . وعلى ذلك فهذه التقديرات تسمح بتقدير نشاط فيتامين د .

هذا ويعرض جدول (١٩) الفروق الأساسية بين حساسية الطرق الحيوية المختلفة لتقدير فيتامين د .

Assay	Time required for assay	Minimal level detectable in assay		Usual working range
		ng	nmol	
Rat line test	7 days	12	0.03	25-300 ng
AOAC chick	21 days	50	0.13	50-1250 ng
Intestinal Ca^{2+} absorption				
In vivo				
$^{45}Ca^{2+}$	1 day	125	0.33	0.125-25 g
$^{47}Ca^{2+}$	1 day	125	0.33	0.125-25 g
In vitro				
Everted sacs	1 day	250	0.65	250-1000 ng
Duodenal uptake of $^{45}Ca^{2+}$	1 day	250	0.65	250-1000 ng
Bone Ca^{2+} mobilization				
In vivo	24 hr	125	0.32	0.125-25 g
Body growth	21-28 days	50	0.06	50-1250 ng
Immunoassays for calcium-binding protein	1 day	1	0.0025	1-20 ng

جدول (١٩) فروق الحساسية بين الطرق الحيوية المختلفة لتقدير فيتامين د .

الاختبار اللونى لفيتامين د (Stroev and Makarova, 1989)

يعتمد الأختبار على خاصية فيتامين د فى تفاعله مع الأنيلين ، فعند تفاعل فيتامين د مع الأنيلين – هيدروكلوريد تتكون نواتج ملونة .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الجواهر الكشافة : -

١ - زيت سمك .

٢ - جوهر الأنيلين - هيدروكلوريد ١٪ .

التكنيك :-

١ - فى أنبوبة أختبار نظيفة جافة ، يؤخذ ١٠ نقط من جوهر الأنيلين ثم يضاف إليها ٥ نقط من زيت السمك.

٢ - تسخن محتويات الأنبوبة بحذر شديد حتى الغليان مع الرج باستمرار

٣ - يغلى المخلوط لمده ٣٠ ثانية .

٤ - فى حالة وجود فيتامين د ، يتكون مستحلب أصفر yellow emulsion فى البداية ثم يتحول إلى لون أخضر داكن dingy - green ثم إلى لون بنى - أحمر أو أحمر.

تقدير فيتامين د بالطريقة اللونية (Gyorgy and Rubin , 1950)

من خواص فيتامين د أنه يعطى لون برتقالى مع ثلاثى كلوريد الأنتيمون ، وأستغل هذا الأساس فى تقديرة لونياً ، ولكن تتمثل صعوبة تقديره فى طول خطوات استخلاصه فى صورة نقية فعند اضافة محلول $SbCl_3$ الخالى من الكحول والجاف (مذاب فى كلوروفورم) إلى محلول فيتامين د٢ أو د٣ ، فإنه يتكون لون برتقالى يمكن قياسه سبكتروفو تومترياً أو بواسطة جهاز قياس الألوان على طول موجة ٥٠٠ nm . ومما هو جدير بالذكر إن الـ tachysterol يعطى نفس التفاعل الذى يعطيه فيتامين د٢ أو د٣ . أما أذا وجدت الأستيرولات sterols مثل الكولسيترول فإنها لا تتداخل مع التفاعل حتى تركيز ٨٠ ضعف من تركيز فيتامين د فى المحلول المختبر . فيتامين أ أيضا يعطى تفاعل كار - بريس مع $SbCl_3$ والذى له أقصى أمتصاص مختلف (٦٢٠ nm) ، وعلى ذلك فهو لايتداخل مع تقدير فيتامين د بشرط ألا يزيد تركيزه عن ٦ أضعاف تركيز فيتامين د . وازالة جميع المواد المتداخلة مع التفاعل بواسطة طرق كروماتوجرافى الادمصاص يزيد حساسية التفاعل اللونى الخاص بتقدير فيتامين د .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الأعمدة الكروماتوجرافية :-

يلزم للفصل الكروماتوجرافى أعمدة ١,٦ × ١٥ سم من زجاج البيركس ، وتنظف جيداً قبل أن تملء بعامل الإدمصاص بنقعها فى محلول حمض كروميك - $H_2\ SO_4$ Conc. dichromic acid ، ثم تشطف جيداً بالماء ثم بالكحول وأخيراً تجفف جيداً .

وعامل الإدمصاص المستخدم يجب أن يكون على درجة عالية من النقاوة (AR) ، وعامل الادمصاص المناسب هو activated bentonite clay (superfiltrol) ، وأعمدة الفصل الأولى تحضر بوضع قطعة صغيرة من القطن فى قاع العمود ويوضع عليها عامل الأدمصاص حتى ارتفاع ٦ سم (مع مرعاة ملء العمود بالطريقة الصحيحة باستخدام التفريغ أذا لزم الأمر) . ونستمر فى ملء العمود بعامل الادمصاص حتى يصبح أرتفاعه فى العمود المعبأ هو ٣ سم . والاعمدة الأخرى اللازمة لفصل فتيامين د عن الأسيترولات تحضر بنفس الطريقة ، فيما عدا إن أرتفاع عامل الأدمصاص فى العمود المعبأ النهائى هو ١,٥سم.

الجواهر الكشافة : -

١ - عامل الإدمصاص Superfiltrol .

٢ - محلول KOH كحولية : - ويحضر بأذابة ١٤ جم KOH نقيه فى كحول ايثايل ٩٥٪ ويكمل إلى ٥٠٠ مل . ويجب المحافظة على هذا المحلول من غاز CO_2 ، كما يستعمل الرائق منه .

٣ - أيثير ثنائى الأيثايل AR : يمكن استخدامه بدون تنقيه لعمليه أستخلاص المواد الغير متصبنه ولعمليه الأحلال من العمود .

٤ - ايثير ثنائى الأيثايل AR لامائى (جاف) : - وينقى هذا الايثير بغسيله بمحلول $Fe\ SO_4$ ١٪ لازاله البيروكسيدات منه ، ثم غسيله ١٠ مرات بالماء المقطر لأزالة الكحول ، ويجفف بواسطة $P_2\ O_5$ ثم يرشح ويخزن ومعه صوديوم ويقطر للتخلص من الصوديوم اذا لزم الأمر. يستخدم هذا الايثير للفصل الكروماتوجرافى .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٥ – Skellysolve : – وينقى بالرج مع H_2SO_4 conc. ثم يغسل مرتين بمحلول ١٠٪ Na_2CO_3٪ ثم بمحلول مكون من ١٠ ٪ Na_2CO_3 و ٥ ٪ $KMnO_4$ ، ويغسل ١٥ مرة بالماء المقطر وينقل إلى دورق جاف ويجفف بالصوديوم ، ثم بعد ذلك يقطر على ٦٨ – ٧٠°م (للتخلص من الصوديوم) ، ويستبعد أول ٥٪ من المقطر وآخر ١٠٪ من ناتج التقطير .

٦ – كحول أيثايل مطلق .

٧ – كلوروفورم نقى (AR) : – يغسل بحوالى ٧ أمثال حجمة بالماء ثم يجفف بـ K_2CO_3 لامائية ، ويقطر (يستبعد أول ١٠٪ من ناتج التقطير) . وهذا الكلوروفورم المنقى نسبياً غير ثابت ، لذلك فيحضر بكميات صغيرة ويحفظ بعيداً عن الضوء ، وقبل أستعماله يختبر بمحلول نترات فضة (للكشف عن الكلوريدات)، وبمحلول KI ونشا(للكشف عن العوامل المؤكسدة) . فى حاله عدم وجود هذه العوامل ، يرج الكلورفورم مع فحم نشط ويرشح قبل الأستعمال مباشرة .

٨ – جوهر $SbCl_3$: – ويحضر بإذابة ١٨ جم $SbCl_3$ (AR) فى كلوروفورم نقى ، ثم يخفف إلى ١٠٠ مل ويضاف إليه بعد ذلك ٢ مل كلوريد أستيل acetyl chloide مقطر . وللحصول على أفضل نتائج يحضر هذا الجوهر وقت التقدير .

٩ – ثيوفين thiophen (AR) خالى من البنزين : – ويجفف بالصوديوم ، ثم يقطر ويرج مع superfiltrol قبل الأستعمال .

التكنيك : –

١ – توزن عينة زيت سمك بالضبط فى دورق مخروطى ١٢٥ مل (العينات) التى تحتوى على ٤٠٠٠ – ١٠٠٠٠٠ وحده USP من فيتامين د مناسبة لهذا التحليل)، وفى حالة الزيوت الطبيعية تكون الوزنه حوالى ٥,٠ – ٢٠٠ جم بالضبط . اما فى حاله المركزات تكون حوالى ١,٠ جم بالضبط .

٢ – فى حاله العينات التى وزنها ١ جم أو أقل ، يضاف ١٠ مل من محلول KOH

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الكحولية ، أما فى حالة العينات الأكثر من ذلك فيضاف ١٠ مل KOH كحولية لكل ١ جم عينة .

٣ - تتم عملية التصبن فى حمام مائى على ٧٠ - ٧٥° م فى وجود مكثف عاكس لمدة ساعة أو أكثر إذا لم تكتمل عملية التصبن ، ويرج الدورق كل حين للمساعده على اتمام التفاعل (عند هذه النقطة يمكن ترك العينة طوال الليل) .

٤ - تبرد العينة إلى درجة حرارة الغرفة ، ثم يضاف ٢٠ مل ماء لكل ١٠ مل من محلول KOH الكحولية ، وبعد ذلك تستخلص المواد الغير متصبنة فى قمع فصل بالإيثير ٤ مرات (٢٥ مل لكل مرة) . وفى حالة تكون مستحلبات عند الفصل ، يضاف بضع نقط من الكحول لكسر هذا المستحلب . وأخيراً تجمع المستخلصات الإيثيريه مع بعضها البعض .

٥ - يغسل المستخلص الايثيرى بـ ٥٠ مل ماء ، وعندما تكون الطبقتين رائقتين ، تهمل طبقة الماء وتكرر عملية الغسيل مرتين (٥٠ مل ماء لكل مرة). الرج أثناء هذه العملية قد يسبب تكوين مستحلب ، ولكسره يضاف ٢ مل كحول و ٢٥ مل ماء ويرج جيداً ويترك حتى تنفصل الطبقتين . وتتم عملية الغسيل عدة مرات حتى يصبح الماء الناتج من الغسيل متعادل التأثير ولايحتوى على إى آثار للقلوية (يختبر بدليل فينول فيثالين) .

٦ - يجفف المستخلص الايثيرى بترشحيه خلال كبرتيات صوديوم لامائية مع مرعاة غسيل قمع الفصل وكبريتات الصوديوم بـ ٢٥ مل ايثير أضافية لإزاله كل فيتامين د العالق بها . ولابد أن يكون المحلول عديم اللون .

٧ - يبخر الايثير من المستخلص حتى الجفاف تحت ضغط منخفض فى حمام مائى على ٥٠ °م ، ثم تذاب المادة الباقية الجافة فى ٥ مل من مخلوط مذيبات خاص تم تحضيره من المذيبات المنقاة (٥٠ جزء Skellysolve و١٠ أجزاء ايثير جاف و جزء واحد من الكحول المطلق) . وتضاف نقطة محلول Sudan III (٢٥ ملجم /

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لتـر من المخلوط السـابق) ، وهذا بمثـابة color marker فى فـصل فيتـامين أ والصبغات عن فيتامينات د .

٨ - يضاف ١٠ مل من مخلوط المذيبات السابق ذكره إلى العـمود الكـروماتوجـرافى (٣ سم ، موضوع أعلى دورق تفريغ ، ويمكن استعمال قمع بوخر بمضخة) ، ثم تضـاف العينة ويغسل الدورق بـ ٥ مل من المذيب ثم تضـاف للعـمود ، وأخـيراً يضـاف ٣٥ مل من نفس المخلوط حتى تظهر الـ adsrption bands . وكل أضـافة من هذا المذيب تجرى قبل أن يجف سطح عامل الأدمصاص .

٩ - عندمـا تمر آخـر ٣٥ مل من المحلول خـلال العـمود ، يجـفف عـامل الادمـصـاص بتمرير هواء خـلال العمود لمدة ٥ - ١٠ ق ، ثـم بواسطة ملعقـة معمل L - bent spatula تزال الطبقـة العليا من العمـود إلى نقطة ٢ مم أسـفل باند السـودان ٣ الحمراء red sudan III band ، فمع هذه الطبقة يزال فيتـامين أ والصبـغات ، وعامل الأدمصاص الباقى فى العمود يحتوى على فيتامينات د و الأسيترولات .

١٠ - يوضـع العـمـود الكرومـاتوجـرافى على قـمـع تفـريغ ويحل elute بـواسطه ٢٥ مـل أيثير .

١١ - يجمع المحلول الراشح والمحلول المحل ويبخر حتى الجفاف تحت ضغط منـخفض ثم تذاب فى ١٠,٠ مل كلوروفورم نقى .

١٢ - فى دورق صـغـيـر ، يؤخـذ ١٠ مـل من هذا المحلول ويضـاف لهـا ١٠ مـل جـوهر $SbCl_3$ وتحرك رحوياً لمدة ٣٠ ثانية ثم يقاس اللون فى جهاز قياسى الالوان على طول مـوجـة ٥٠٠ nm بعـد ٣ ق بالضـبط من أضـافـة جـوهر الكشـاف إلى عـينة الفيتامين . والعينة عند هذه النقطة تحتوى على فيتامين د والأستيرولات.

١٣ - لتـصـحـيح الأمـتـصـاص على طول مـوجـة ٥٠٠ nm والذى يرجع إلى وجـــود الأسيترولات ، يؤخذ ١,٠ مل من مستـخلص الكلوروفورم ويبـخر حتى الجفاف ثم يذاب فى ٥ مل مـخلوط مكون من skellysölve وبنزين (١ : ٢)، وبعـد ذلك تنقل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كمياً إلى العمود الكروماتوجرافى الصغير (١,٥ سم ، متصل بدورق تفريغ ومضخة) والمبلل بـ ٥ مل من مخلوط المذيب . يغسل الدورق الذى يحتوى على فيتامينات د والأسيترولات بـ ٥ مل اضافية من مخلوط المذيب وتوضع فى العمود، وأخيراً تحل الأسيترولات من العمود بـ ٥ مل مخلوط مذيب .

١٤ - الباند التى تحمل فيتامين د تكون ثابتة على الجزء العلوى من العمود وتكون ملونة بلون بنفسجى شاحب - أزرق lavender - blue band ، أما الأسيترولات فقد مرت خلال العمود إلى الراشح .

١٥ - يبخر الراشح حتى الجفاف تحت ضغط منخفض ثم تذاب المادة الباقية فى ١,٠ مل كلوروفورم ، ويضاف إليها ١٠ مل جوهر $SbCl_3$ ، و أخيراً يقاس اللون على طول موجة ٥٠٠ nm بعد ٣ ق بالضبط ، مثل المعاملة الأولى تماماً .

١٦ - من الفرق بين القراءتين السابقتين يمكن حساب كمية فيتامين د بوحدات USP لكل جرام من الزيت عند ضرب هذا الفرق فى عامل مقداره ١٩٣٠٠ . هذا ، وشكل (٢٦) يلخص خطوات هذه الطريقة .

التعليق : -

وجد توافق جيد بين هذه الطريقة اللونية والطريقة البيولوجية المعتادة ، وهذا بالنسبة للزيوت التى تحتوى على ٥٠٠٠ وحدة / جم فاكثر . أما بالنسبة للزيوت التى تحتوى على أقل من ذلك فهذه الطريقة غير كافية .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Schematic Outline of Vitamins D Determination

I. **Saponify with alcoholic KOH and extract with ether**

(a) ← → (b)

II. **Ether extract** — **Soap residue (discard)**

(a) **Evaporate off** ether completely

Dissolve residue in mixture of Skellysolve, ether, and alcohol

(b) **Chromatograph** on Superfiltrol, **6-cm. column**

(a) ← → (b)

III. **Filtrate** (contains vitamins D and sterols) — **Chromatogram**

dry

(d) ← → (e)

Lower layer (contains traces of vitamins D and sterols) — **Upper layer (contains vitamin A, dye, etc.) (discard)**

(c)

Elute with ether

(f) ← → (g)

Eluate — **Adsorbent (discard)**

Mixture $(c + f)$

Evaporate off solvents

Dissolve residue in $CHCl_3$

IV. (a) $CHCl_3$ solution, divide **into 2 parts** (b)

Measure extinction of vitamins D and sterols (a) — **Evaporate to dryness**

Dissolve residue in Skellysolve and benzene

Chromatograph on Superfiltrol

(c) ← → (d)

Filtrate (contains **sterols**) — **Absorbent (discard)**

Evaporate solvents completely

Dissolve residue in $CHCl_3$

Measure extinction **of sterols** (e)

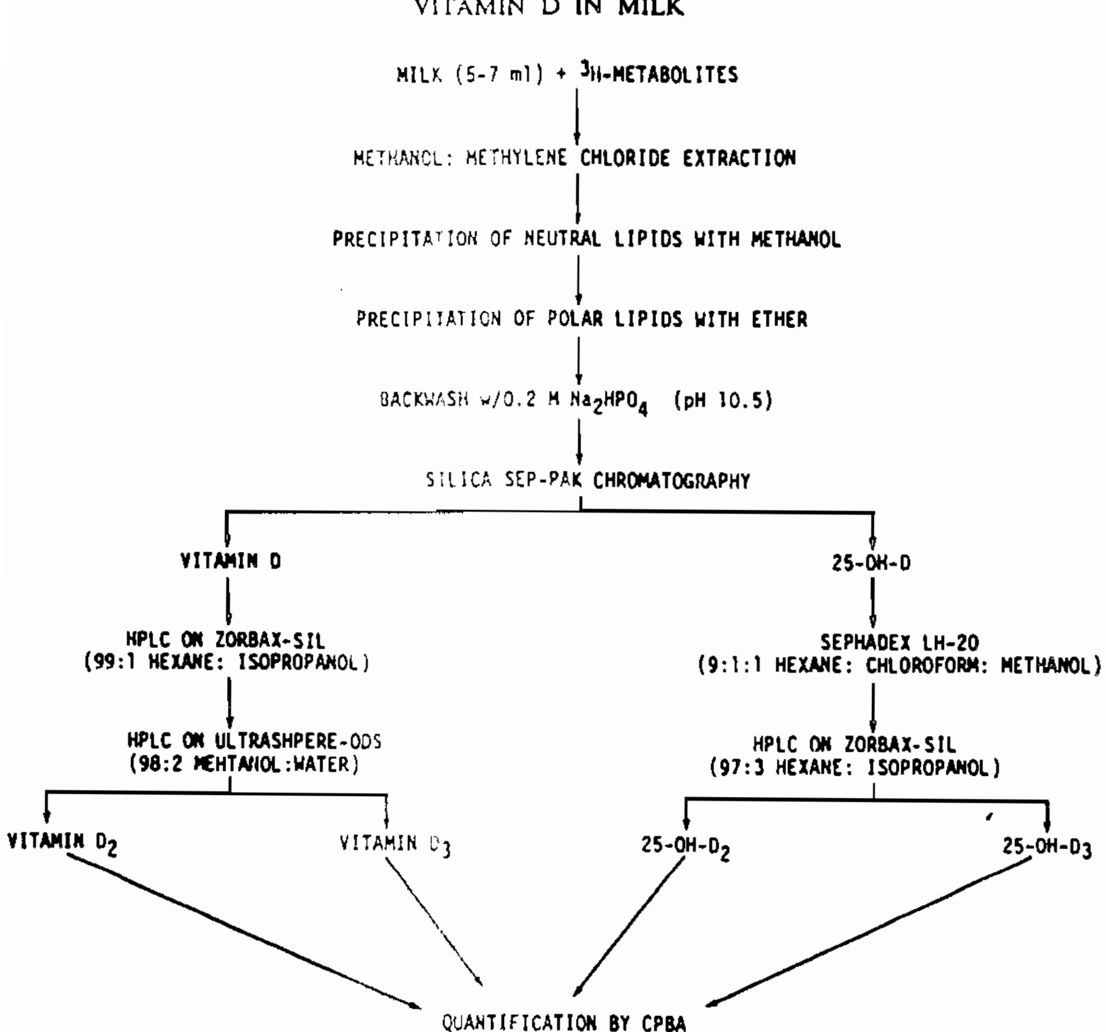
V. **Vitamins** D E (1%, 1 cm.) value (IV*a* — IV*e*) × *factor* = **units per gram of oil**

شكل (٢٦) خطوات تقدير فيتامين د بالطريقة اللونية

تنقيه فيتامينات د (Hollis , 1983)

ومـا هو جدير بالذكر أن هناك طرق كثيرة لتنقية فيتامينات د من مصـادرها الطبيـعية حـتى يتـسنى تقـديرها . ومن أبرز هـذه الطرق ، طريقـه (Hollis, 1983) والتى تسـتـخلص فيتامينات د من اللبن . وشكل (٢٧) يلخص خطوات تنقية فيتامينات د وتقدير كل منها كمياً .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



Schematic of the purification and ultimate **quantification steps used for the assay of vitamin D_2, D_3, 25-OH-D_2, and 25-OH-D_3** in human milk.

شكل (٢٧) خطوات تنقية وتقدير مجموعة فيتامين د فى لبن الإنسان .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فيتامين هـ Vitamin E

تشمل مجموعة فيتامين هـ ثمانية مركبات مختلفة ، أربعة منها ينتمون إلى التوكوفيرول (T) وفيها تكون السلسلة الجانبية مشبعة ، أما الأربعة الباقية فينتمون إلى التوكوترای أينول (T-3) ، حيث يوجد على السلسل الجانبية ٣ روابط زوجية . كما يختلف أفراد هاتين المجموعتين فيما بينهما فى عدد ومكان مجاميع الهيدروكسيل على الحلقة ، فعلى المواضع ٥ , ٧ , ٨ تسمى ألفا (α) ، وعلى المواضع ٥ , ٨ تسمى بيتا (β) ، وعلى المواضع ٧ , ٨ تسمى جاما (γ) ، وعلى الموضع ٨ فقط تسمى دلتا (γ) . وشكل (٢٨) يعرض الصيغة البنائية لمجموعة فيتامين هـ .

Tocol Structure

Trienol Structure

Position of Methyls	Trivial Name (Abbreviations) Tocol Structure	Trienol Structure
5,7,8	α-tocopherol (α-T)	α-tocotrienol (α-T-3)
5,8	β-tocopherol (β-T)	β-tocotrienol (β-T-3)
7,8	γ-tocopherol (γ-T)	γ-tocotrienol (γ-T-3)
8	δ-tocopherol (δ-T)	δ-tocotrienol (δ-T-3)

Formulas of eight members of the tocopherol series.

شكل (٢٨) الصيغة البنائية لمجموعة فيتامين هـ

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تفاعلاته :

التوكوفيرولات ثابتة للحرارة ، والقلوى فى غياب الأكسجين ، وهى لا تتأثر بالحامض حتى ١٠٠° م . وتتأكسد ببطء بأكسجين الهواء الجوى وتزداد سرعة الأكسدة بالتعرض للضوء والحرارة والقلوى ووجود أملاح الحديد والنحاس . ويزداد فعل العامل المؤثر فى وجود عامل آخر . واسترات مجموعة الهيدروكسيل الفينولية ثابتة جداً للأكسدة بالأكسجين ، وعلى ذلك فإن التوكوفيرول يجهز تجارياً فى صورة استر الخلات . ولذا فإن هذه الإسترات ليس لها فعل كمضادات للأكسدة . ونواتج الأكسده تتضمن tocopheroxide وtocopheryl quinone و tocopheryl hydroquinone ، هذا بالأضافة إلى dimers و trimers .

ومما هو جدير بالذكر أنه عند معاملة الألفاتوكوفيرول بنترات الفضة يتأكسد أيضاً إلى ألفاتوكو فيرول كوينون ، وهذا بدوره يمكن اختزاله إلى كوينول quinol بواسطة الزنك وحمض الخليك . كما يمكن أكسدة الألفاتوكوفيرول بواسطة حمض النيتريك إلى أورثوكوينون ذو لون أحمر ، واستغل هذا التفاعل فى تقدير التوكوفيرولات كمياً . ويلخص شكل (٣٠) تفاعلات

شكل (٣٠) تفاعلات أكسدة الألفاتوكوفيرول بالعوامل المؤكسده المختلفة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أكسدة التوكوفيرول بالعوامل المؤكسده المختلفة ، أما جدول (٢٠) يعرض بعض الخواص الكيميائية لأربعة أفراد من مجموعة فيتامين هـ .

Chemical Properties

Item	dl-α-Tocopherol	d,α-Tocopherol	dl,α-Tocopheryl acetate	d,α-Tocopheryl acetate
Color	Colorless to pale yellow, viscous oil	Colorless to pale yellow, viscous oil	Colorless to pale yellow, viscous oil	Colorless to pale yellow, viscous oil
Boiling point (°C)	200-220 (0.1 mm)	-	224 (0.3 mm)	-
Molecular weight	430.69	430.69	472.73	472.73
Spectrophotometric data				
Absorption maxima (nm)	292-294	292-294	285.5	285.5
$E^{1\%}_{1cm}$ (ethanol)	71-76	72-76	40-44	40-44

جدول (٢٠) الخواص الكيميائية لبعض التوكوفيرولات

الذوبان :

الألفاتوكوفيرول لاينوب فى الماء ولكنه ينوب تماماً فى الزيوت والدهون والأسيتون والكحول والكلوروفورم والإيثير والبنزين ومذيبات الدهون الأخرى .

انتشاره ومصادره :

١ - **وجوده فى النباتات** : - يوجد فى الفواكه مثل التفاح والزيتون ، وفى الخضراوات مثل الخس والبقوليات legumes والسبانخ spinach والذرة وزيت فول الصويا والمستردة mustard والفلفل الأخضر green pepper والبطاطا sweet potatoes والقرنبيط cauliflower والكرنب Kale واللفت الأخضر . كما يوجد فى البنور الزيتية مثل بذرة القطن وزيت النخيل palm oil والفول السودانى peanuts وجوز الهند coconuts . وفى الحبوب cereal كما فى جنين الأرز وجنين القمح والشعير barley والراى rye والشوفان .

٢ - **وجوده فى الحيوانات** : - يوجد فى بيض الطيور، وفى كبد ودهن وعضلات الحيوانات الثديية ، وفى اللبن والغدد النخامية والكظرية والخصى testes .

٣ - **وجوده فى الكائنات الحية الدقيقة** : - يوجد فى الخميرة yeast .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** : - يتراوح تركيزه فيها من ٥٠ - ٣٠٠ ملجم لكل ١٠٠جم ، كما فى زيوت كل من بذرة القطن و الذرة و فول الصويا و جنين القمح والقرطم safflower والخس .

٢ - **المصادر المتوسطة** : - ويتراوح تركيزه فيها من ٥ - ٥٠ ملجم / ١٠٠ جم، كما فى زيوت كل من جوز الهند والفول السودانى والزيتون ، وفى بذور التفاح والألفاألفا alfa alfa وجنين القمح والشعير وفول الصويا الجاف وبذور الفول السودانى والخميرة والشيكولاته chocolate والسبانخ والأسبراجس asparagus والكرنب cabbage .

٣ - **المصادر المنخفضة** : - ويتراوح تركيزه فيها من ٠,٥ - ٥ ملجم /١٠٠جم، كما فى الجزر والمستردة والذرة وأوراق الخس والحمص peas و البطاطا والفلفل واللحم البقرى beef وكبد البقر ولحم الخنزير pork ولحم الحمل lamb والزبده والبيض والجبن . ودقيق كل من الذرة والقمح الكامل والشوفان وجوز الهند.

الدور الطبى والغذائى :

١ - وحدات فيتامين هـ : -

١ ملجم ألفا - م - توكوفيرول d α - tocopherol = ١,٤٩ وحدة دولية .

١ ملجم ألفا -م ى - توكوفيرول d l -α - tocopherol = ١,٠ وحدة دولية

٢ - مستويات الدم الطبيعي فى الإنسان : -

١,١١ ملجم / ١٠٠ مل سيرم

٣ - المقررات الموصى بها : -

للأطفال : ١٠ - ١٥ وحدة دولية / يوم .

للبالغين : ٢٥ وحدة دولية / يوم (للإناث) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣٠ وحدة دولية / يوم (للرجال) .

حالات خاصة : وذلك على حسب الأحماض الدهنية الغير مشبعة المأخوذة ، وتزداد المتطلبات اليوميه منه للحوامل والمرضعات وفى حالات الجهد الشاق strss وحالات التخلص من السمية detoxification وفى مرحلة البلوغ .

٤ - اعطائه : -

يعطى عن طريق الحقن فى حالة الاحتياج إليه بجرعات عالية ، ويعطى سطحياً أيضاً فى صورة كريمات ومراهم ، وأفضل طريقة لأعطائه هى عن طريق الفم .

٥ - أمراض النقص : -

أ - فى الحيوانات المعملية :- موت وهدم موضعى لخلايا الكبد necrosis ، لين الدماغ encephalomalcia ، سوء تكوين العضلات muscular dystrophy ، تفسخ (انحلال) الأنسجة التناسلية degeneration of reproductive tissues

ب - فى الإنسان : - تحلل خلايا الدم الحمراء red cell hemolysis ، زيادة الكرياتين فى البول creatinuria ، الأصفرار xanthomatosis ، تليف المرارة cirrhosis of gall bladder ، skin collagenosis ، تدفق دهنى steatorrhea

٦ - أعراض نقصه : -

بالإضافة إلى الأعراض السابقة تظهر الأعراض التالية :-

تليف تكيسى للبنكرياس cystic fibrosis (للحيوانات الصغيرة) ، ضعف نشوء العضلات وهزال عضلى فى حيوانات التجارب ، أمتصاص الأجنة وأنحلال الأنسجة الطلائية الحديثة وأضطراب الدورة الشهرية estrus cycle (فى الفئران) ، myocordial degeneration (فى الكلاب والأرانب) ، لين الدماغ encephalomalacia ، انحلال الجهاز الوعائى الدموى vascular degeneration (فى الدجاج) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٧ - تأثير الجرعات العالية : -

عند اعطاء جرعات عالية منه ، من المحتمل انها تزيد ضغط الدم .

٨ - توزيعه فى أنسجة جسم الأنسان : -

يختلف توزيع فيتامين هـ فى أنسجة جسم الإنسان أختلافاً كثيراً ، فأقصى كمية منه وجدت فى الأنسجة الدهنية والغدة الكظرية ، وأقل قيمة لوحظت فى خلايا الدم الحمراء . وجدول (٢١ أ) يلخص ذلك .

٩ - توزيعه فى المكونات التحت خلوية (التوزيع التحت خلوى) : -

تتمركز كمية كبيرة نسبياً من التوكوفيرول فى الميتوكوندريا الثقيلة ، وأقل كمية منه لوحظت فى النواة . ومن ذلك يدل على أهمية فيتامين هـ كمانع للاكسده ، حيث تتعرض الميتوكوندريا للاكسجين بكثرة فلذلك يلزم حمايتها من التلف بالأكسدة . وجدول (٢١ ب) يلخص توزيعه التحت خلوى فى أنسجة الفأر .

١٠ - جميع الكائنات الحية تحتاج التوكوفيرلات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

α-Tocopherol Content of Human Tissues

Tissue	Normal µg/g	Normal mg/g Lipid	Cystic fibrosis (µg/g)
Plasma	9.5	1.4	2.4
Erythrocytes	2.3	0.5	0.5
Platelets	30.0	1.3	–
Adipose tissue	150.0	0.2	–
Kidney	7.0	0.3	–
Liver	13.0	0.3	3.5
Muscle	19.0	0.4	2.6
Ovary	11.0	0.6	–
Uterus	9.0	0.7	–
Heart	20.0	0.7	–
Adrenal	132.0	0.7	–
Testis	40.0	1.0	–
Pituitary	40.0	1.2	–

Subcellular Distribution of Tocopherol in Rat Tissue

Cell fraction	Tocopherol in liver µg/mg Protein	Tocopherol in liver %[a]	Tocopherol in heart µg/mg Protein	Tocopherol in heart %
Soluble	0.002	.4	0.02	1.7
Heavy mitochondrial	0.27	53.8	0.26	21.8
Light mitochondrial	0.12	23.9	0.29	24.4
Microsomal	0.08	15.9	0.37	31.1
Nuclear	0.03	6.0	0.25	21.0

[a]Percentage of total recovered in five fractions.

جدول (٢١) توزيع الألفاتوكوفيرول فى أنسجة الإنسان (أ)

وفى المكونات التحت خلوية فى أنسجة الفأر (ب)

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تحليل فيتامين هـ

فصل وتقدير فيتامين هـ

أ - تحضير العينة والاستخلاص : -

العينات قليلة الليبيدات مثل بلازما الدم وبعض الأنسجة الأخرى يمكن استخلاصها مباشرة بمذيبات الدهون التقليدية مثل : - كلوروفورم - ميثانول ، أو هسكان - إيثانول ، أو الاسيتون ، أو بأى طريقه أخرى ، أما فى العينات الغذائية فيمكن تصبنها أولاً بمحلول بوتاسا كاوية كحولية ثم تستخلص بعد ذلك المواد الغير متصبنة والتى تحتوى عاده على الفيتامين بالايثير . وحيث أن التوكوفيرولات حساسة للاكسده فى الوسط القلوى ، فعليه لابد من إجراء التصبن تحت نيتروجين . ويفضل وجود مادة مانعة للاكسده مثل حمض الأسكوربيك أو البيروجالول pyrogallol او p-hydroxyacetanilid . ولابد أن تكون مدة التصبن قصيرة قدر الأمكان ، حتى لاتحدث تفاعلات الأكسدة (شكل ٢٩) .

α-TOCOPHEROL ⇄ ($O_2^{\top}$, $FeCl_3$ / Ascorbic acid) α-TOCOPHEROXIDE (Unstable)

α-TOCOPHERYL HYDROQUINONE (Unstable) ⇄ α-TOCOPHERYL QUINONE (Stable)

$R = [CH_2CH_2CH(CH_3)CH_2]_3H$

شكل (٢٩) نواتج أكسدة الألفاتوكوفيرول

هناك طريقة اخرى بديلة للاستخلاص ، وهى استخلاص الدهن مباشرة من العينة الغذائية بمذيب عضوى ثم تركيز الفيتامين هـ فى المستخلص بالبلورة crystallization على

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

درجة حرارة منخفضة . ومن المناسب استخلاص الليبيدات بجهاز سوكسلت Soxhlet بكحول ساخن ، أو ٢ - بروبانول وكلوروفورم ساخن فى حالة منتجات الحبوب والأغذية المجفدة freeze - dried ، أما الانسجة الرخوة soft مثل الكبد فيمكن طحنها مع كبريتات صوديوم حتى يتم الحصول على مخلوط جاف ، ثم استخلاص الليبيدات منها بسوكسلت أو الرج مباشرة وبشدة مع المذيب العضوى . ويمكن بللورة الليبيدات من المستخلص بالتبريد بمخاليط أسيتون مع ثانى أكسيد الكربون الصلب (- ٦٥ إلى - ٧٠° م) ثم ترشيح المخلوط البارد على قمع بارد على نفس درجة الحرارة . ويحتوى الراشح filtrate على التوكوفيرولات الحرة والتى يمكن الحصول عليها بعد ذلك بتطاير المذيب ، أما إسترات فيتامين هـ فسوف تبقى فى الجزء المتبلور .

وبعد الاستخلاص يمكن تنقيتها باستعمال الطرق الكروماتوجرافية السابق ذكرها .

ب - فصل فيتامين هـ : -

يمكن الحصول على فيتامين هـ من أحد مصادره (زيت فول صويا أو زيت جنين القمح أو زيت الأرز) كما يلى : -

١ - أجراء عملية التصبن للزيت باستعمال بوتاسا كاوية فى ميثانول ، ثم استخلاص المواد الغير متصبنة والتى تحتوى على الفيتامين بالإيثير .

٢ - ترسب الأسيترولات بإضافة Digitonin .

٣ - يتم التخلص من الزانثوفيلات xanthophylls بالاستخلاص بالميثانول .

٤ - تحول التوكوفيرولات إلى أسترات الوفينية allophanate esters بالتفاعل مع HCN .

٥ - يتم بللورة هذه الاسترات والحصول عليها بالترشيح ، ثم تحليلها مائياً ، وأخيراً نحصل على فيتامين هـ بالاستخلاص بالأيثير.

حـ - الفصل والقياس : -

القياس اللونى والتحليل الكروماتوجرافى الغازى هما أكثر الطرق أنتشاراً فى تقدير

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فيتامين هـ ، والقياس اللونى طريقة سريعة لتقدير المحتوى الكلى للتوكوفيرولات فى الأغذية ، فلو طلب معرفة كل توكوفيرول على حده فيمكن تطبيق الـ GC بنجاح . أما القياس الأسبكتروفوتومترى فى الـ UV فهو أقل أستخداماً وذلك لأنخفاض الأمتصاص (molar absorbance) للتوكوفيرولات ، حيث أن الألفاتوكوفيرول له = ٧٢ على طول موجه ٢٩٢ nm . والتوكوفيرولات تعطى وميض ، والقياس الوميضى ذو فاعلية كبيرة وذات حساسية كبيرة فى تقدير التوكوفيرولات .

١ - القياس اللونى Colorimery : -

تفاعل أمرى - أنجل Emmerie -Engel reaction : -

يعتمد هذا التفاعل على تكوين لون أحمر أو أرجوانى purpole من التفاعل بين أيونات الحديدوز (Fe^{++}) ferrous ومركب $\alpha - \grave{\alpha}$ - dipyridyl . وحيث أن التروكوفيرولات ذات مقدرة عالية على أختزال أيونات الحديديك ferric إلى حديدوز ، فيمكن بذلك تقدير فيتامين هـ عن طريق تفاعله مع أيونات الحديديك ثم تقدير أيونات الحديدوز المتكونه بتفاعلها مع $\alpha - \grave{\alpha}$ - dipyridyl فيتكون لون أحمر أو أرجوانى كما يلى : -

$$\text{Tocopherol} + Fe^{+++} \longrightarrow Fe^{++} \xrightarrow{\alpha - \grave{\alpha}\text{ - dipyridyl}} \text{Red color}$$

وقد تم تعديل هذا التفاعل بأستعمال مركب - Bathophenanthroline(4,7 diphenyl 1,10 phenanthroline) ، بدلاًمن α - $\grave{\alpha}$ - dipyridyl والذى يتميز بحساسيته الكبيرة ، ويتكون فى التفاعل ايضاً معقد ذو لون أحمر . وهذا التفاعل حساس ويعتمد على نتائجة بشرط أزالة المواد التى قد تتداخل فى التفاعل حيث يتأثر التفاعل بوجود الكاروتينويدات والمواد الملونة الأخرى ومضادات الأكسده مثل BHA و BHT . والعائق الرئيسى لهذا التفاعل هوأنه غير مناسب للتمييز بين التوكوفيرولات المختلفة كل على حده أو tocotrienols . ويمكن أستخدام كروماتوجرافى الأعمده بالومينا غير منشطة بـ ١٠ ٪ ماء لتنقية المستخلصات قبل تقدير التوكوفيرولات بالقياس اللونى ، فلو تم الأحلال بمحلول ٧٪ أيثير فى هكسان حلقى cyclohexane ، يمكن فصل التوكوفيرولات عن الكاروتينويدات والريتينول وعن الكولستيرول (التفاعل اللونى يمكن أن يتحمل tolerate مستويات عالية من

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الكولسيترول) .

ولا يمكن لهذا العمود ازالة المواد المضادة للأكسدة BHA و BHT ، ولا يمكنه أيضاً ازالة مشابهات isomers التوكوفيرولات أن وجدت . ويمكن كشف الأخيرة بالـ TLC ، لذا فإن وجدت فيمكن أزالتها على أعمدة سيليكاجيل جافة أولاً . ويستعمل الـ TLC على سيليكاجيل مع كلوروفورم كطور متحرك لفصل الـ BHT عن التوفيرولات .

ويفصل هذا النظام الـ BHA عن الألفاتوكوفيرولات وليس عن الجاما توكوفيرول والذى له نفس التحرك مثل الـ BHA . ويمكن استعمال التوزيع بين أسيتونيتريل acetonitrile و أيثيربترولى لأزالة الـ BHA . ولكن هذه الطريقة تؤدى إلى فقد بعض من التوكوفيرولات .

واستخدم القياس اللونى لتقدير التوكوفيرلات كل منها على حده ، والـ tocotrienol فى زيوت الخضروات vegetable بفضل مبدئى على TLC. ويمكن استخدام الـ TLC على أتجاهين حتى يعطى فصل أفضل . وأكبر أعتراض على استعمال الـ TLC فى التقدير الكمى لفيتامين هـ هو الفقد الكبير الذى يحدث عند أزالة الـ spots من على الألواح plates والتى يعقبها التقدير .

٢ - قياس الفلورة Fluorimetry : -

التوكوفيرولات لها فلورة طبيعية قوية ، وتستخدم هذه الخاصية كطريقة حساسة لتقديرها فى السيرم والأنسجة وخلافه . وهذه الطريقة أبسط من الطرق اللونية ، فعند تقديرة فى البلازما بهذه الطريقة لا يوجد تداخل مثلما يحدث فى التفاعلات اللونية لفيتامين أ .

وطبق هذا التكنيك فى تقدير التوكوفيرولات فى زيوت الخضروات وبعض الأغذية بعد فصلها على أعمدة كروماتوجرافية خاصة ، وأيضاً بعد فصل كل واحد منها بمفرده بواسطه HPLC . وعادة ما يقاس أنبعاث emission التوكوفيرول على طول موجة ٣٤٠ nm بعد الأثارة excitation على طول موجة ٢٩٥ nm . وقياسات الفلورة لايمكن استخدامها فى تقدير كل توكوفيرول على حده(بمفرده) فى مخاليط منها معاً ، كما إن وجود كميات صغيرة من الريتينول لا تتداخل مع الفلورة ، ولكن الـ BHA يتداخل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أما أسترات التوكوفيرولات ليس لها فلورة ، وعلى ذلك فيمكن باستخدام هذا التكنيك في تقدير محتوى التوكوفيرول الحر والمؤستر. وقد استخدم Lithium aluminium hydride ($LiAH_4$) في التحويل الكمى لأستر التوكوفيرول في السيرم إلى كحول حر ثم قديره بالفلورة. وكل القياسات الفلورية عاده ما يلزم لها مذيبات منقاه بطريقة خاصة .

٣ - التحليل الكروماتوجرافى : -

أ) الطبقة الرقيقة TLC : -

أستخدمت هذه الطرق فى فصل التوكوفيرولات وهى طرق ممتازه ، ومن أهم مميزاتها أنها تتطلب تجهيزات بسيطة . وأهم الأحتياطيات التى يجب أخذها فى الأعتبار هى تلافى الاكسده حيث أنها قد تفقد أثناء أو بعد الفصل إذا تعرضت لظروف مؤكسده .

ب) طرق الـ GLC : -

وتستخدم هذه الطرق في التحليل الكمى والنوعى للتوكوفيرولات . وفيها تحول التوكوفيرولات ومشتقاتها أولاً إلى مشتقات متطايرة مثل أسترات كل من : acetate

. propionate , trifluoroacetate , trimethyl silyl حتى يمكن فصلها في الـ GLC . وهذه الطرق حساسه جداً (مع ميكروجرامات من التوكوفيرولات) . وأمكن حديثاً فصل أربع مشابهات راسيمية racemates وقدرت كميًا أيضاً .

وهناك طرق بديلة لفصل البيتا والجاماتوكوفيرول وهى تحويلهما إلى باراكوينونــــات p- quinones بالتفاعل مع كلوريد حديديك ثم فصلها على خليط مزدوج من طورين ثابتين (XE - 60 , SE - 50)

الأستيرولات خصوصاً الكولستيرول لها نفس زمن الأحتباس retention time للألفا توكوفيرول، ولذلك فلابد من التخلص منها أولاً و قبل أجراء التحليل بالـ GC . ويمكن أزالة الكولستيرول تماماً بترسيبه من أيثانول : ماء (٧٢ : ٢٨) ثم تكمله ترسيبة بأمرار المستخلص خلال عمود celite مشرب بـ ٦٪ digitonin . ومن أهم مميـزات هذا التكنيك عدم تداخل مضادات الأكسده BHT ، BHA في التقدير والفصل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

جـ) طرق الـ HPLC : -

طبق هذا التكنيك أيضاً فى التحليل الكمى والوصفى لتوكوفيرولات الأغذية والأنسجة الحيوانية وغيرها ، ومن أهم مميزاته أنه ذو فاعلية عالية جداً فى فصل وتقدير كل مشابهات التوكوفيرولات ، بالاضافة إلى بساطتها . فقد أمكن فصل ثمان مشابهات منها بهذه الطريقة خلال ١١٠ ق ، كما أمكن أستخدامها فى فصل التوكوفيرولات والـ tocotrienols بعد استخلاص العينة بالأسيتون فى جهاز سوكسلت ، وقد أمكن إزالة الليبيدات بتبريد المستخلص بواسطة مخلوط ثانى أكسيد كربون صلب وأسيتون ، ثم حقن المستخلص الناتج مباشرة فى عمود الـ HPLC . وعلى ذلك ليس من الضرورى إجراء تصبن قبل أستعمال الـ HPLC.

استعمل نوعين من الكواشف فى هذه الأجهزة هما كاشف فلورة وكاشف UV . وقد بينت النتائج أن النوع الأول من هذه الكواشف كان أكثر حساسية ، فهو يمكنه أن يكشف عن كميات نانوجرامات . كما أمكن أيضاً فصل التوكوفيرولات عن استراتها فى مستحضرات مخاليط الفيتامينات multivitamin preparations وفى الأغذية الحيوانية .

د - الطرق الحيوية Bioassay procedures : -

النشاط الحيوى الحقيقى لفيتامين هـ يقدرعن طريق قدرته ability على منع أو اعاقة prevent ظهور أعراض النقص أو انعكاس أعراض نقصه المتخصصة فى الحيوانات in vivo (مثل fetal resorption, muscular dystrophy , encephalomalacia) كما أن هناك أختبارات أخرى يمكن استعمالها للتقدير الحيوى مثل :- اختبار تحلل كرات الدم الحمراء erythrocyte hemolysis test وأختبار التخزين فى الكبد liver storage teot وارتفاع التوكوفيرول فى البلازما elevation of tocopherol plasma . وهذه الطرق لا تقيس النشاط الحيوى فى داخل الكائن الحى in vivo مباشرة ، بل هى انعكاس للامتصاص النسبى للمركبات المختبرة ، أعادة تنظيمها turmover فى الكبد أو فى RBC. عموماً ، أختبارات تحلل كرات الدم الحمراء وتخزين الأنسجة ، تصحح جيداً بالطرق التى تتم in vivo . وقد تصحح بملاحظة فترة نصف الحياة للـRBC فى إنسان مصاب بنقص فيتامين هـ.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

هذا و سوف نستعرض هذه الطرق الحيويه كما يلي : -

١ - امتصاص الأجنة Fetal resorption : -

إن التقدير الحيوى المبنى على أساس قدره الفيتامين على منع العقم anti - sterility يعتمد على قياس الأمتصاص الجنينى fetal resorption فى إناث الفئران الحوامل . وهى طريقة لأختبار الفاعلية الحيوية biopotency لعديد من التوكوفيرولات ، حيث يتم استنزاف فيتامين هـ من أناث الفئران العذارى ثم يتم تزويجها لذكور عادية ، وبعد نجاح التزاوج تعطى كميات متنوعة و معروفة من فيتامين هـ عن طرق الفم (للإناث) .

- وبعد قتل الفئران (بعد ٢٠ - ٢١ يوم من التزاوج) ، يحسب عدد الأجنة الحية living والميته dead والمتصه resorbed ، ثم تقدر النسبة المئوية للأجنة الحية .

يقدر نشاط فيتامين هـ برسم منحنى قياسى للنسبة المئوية للأجنة ضد لوغاريتم الجرعة المعطاة log of dose . وعن طريق هذا المنحنى تحسب كمية فيتامين هـ فى العينة المراد تقديرها . وهذه الطريقة مملة وتستهلك وقت طويل وحيوانات كثيرة ..... إلخ .

٢ -أختبارات الأنحلال (التفسخ) العضلى

Muscular degeneration tests : -

وتطبق هذه الطريقة على الدجاج ، حيث يتم تقييم التفسخ العضلى مباشرة بعد التغذية لمدة ٣ - ٤ أسابيع على علائق خالية من فيتامين هـ وأخرى مضافاً إليها ، ويتم فحص عضلات الصدر breast muscle و تعطى درجات scores من صفر إلى ٤ على حسب خطورة الضرر . ويمكن قياس التفسخ العضلى بطريقة غير مباشرة مثل تقدير الكرياتين فى البول creatinuria ومستويات البلازما من LDH , aspartae amino transferase كما فى البط والأرانب . والطرق التى تعتمد على قياس مستويات أنزيم plasma pyruvate kinase كمرجع هى من الطرق السريعة والحساسة وهى على درجة عالية من الثقة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣- اختبار تحلل كرات الدم الحمراء Erythrocyte Hemolysis Test : -

الطريقة تعتمد أساساً على الفعل الواقى لفيتامين هـ ضد تحلل كرات الدم الحمراء بواسطة فوق أكسيد الهيدروجين أو بواسطة dialuric acid ، وفيها يتم استنزاف الحيوانات rats من فيتامين هـ ، ثم تعطى جرعات من الفيتامين عن طريق الفم حتى تعطى مدى لتحلل كرات الدم الحمراء من ٢٠ - ٨٠ ٪ . يضاف dialuric acid إلى معلق الـ RBC المغسولة والمأخوذة من الحيوانات بعد ٤٠ - ٤٤ ساعة من إعطاء الجرعات المختبره test doses ثم تقدر النسبه المئوية للتحلل hemolysis . وهذه الطريقة معقولة وبسيطة وغير مكلفة وملائمة جداً عن التقدير الحيوى بطريقة امتصاص الأجنة أو بطريقة التخزين فى الكبد .

٤ - التخزين فى الكبد Liver storage : -

تعتمد هذه الطريقة على ملاحظة وهى أن تخزين التوكول tocol فى كبد الفئران والدجاج له استجابة خطية linear لمستوى فيتامين هـ فى الغذاء . فى هذه التجربة تغذى الحيوانات (فئران - دجاج) المستنزف منها الفيتامين على علائق غذائية قياسية بها كميات معروفه بالضبط من فيتامين هـ ، وتغذى مجموعة أخرى على العلائق المختبرة لمدة ٣ - ١٣ يوم، ثم يقدر محتوى الكبد من التوكل فى كل منها . ومن ذلك يستدل (بعد رسم علاقة بين الفيتامين وتخزين التوكول فى الكبد) على تركيز الفيتامين .

٥ - طرق أخرى Other methods : -

مثل التقدير الحيوى الذى يعتمد على النمو growth و testicular degenertion و encephalomalacia .

التفاعل اللونى لفيتامين هـ (Stroev and Makarova , 1989)

الاختبار يعتمد على خاصية التوكوفيرول فى أنه تحت الظروف المؤكسدة القوية (مثل حمض النيتريك المركز) يتكون تركيب كوينويدى quinoid structure ذو لون أحمر .

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول توكوفيرل (٠,١ ٪ فى كحول) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ – حمض نيتريك مركز .

التكنيك : –

١ – فى أنبوبة اختبار نظيفة جافة ، يضاف ٥ نقط من محلول التوكوفيرول ثم يضاف إليها ١٠ نقط من حمض النيتريك المركز .

٢ – تخلط محتويات الأنبوبة بالرج ، ويلاحظ ظهور لون أحمر .

تقدير التوكوفيرول فى السيرم (Baker and Frank , 1968)

يمكن تقدير توكوفيرولات السيرم بقدرتها على اختزال أيونات الحديديك إلى حديدوز والتى تكون الأخيرة معقد أحمر مع مركب α - α`- dipyridyl ، وحتى يتم ذلك تستخلص التوكوفيرولات والكاروتينات أولاً بالزيلين xylene ثم يقاس الامتصاص على طول موجة ٤٦٠ nm لتقدير الكاروتينات . ويجرى تصحيح correction للكاروتينات بعد اضافة كلوريد الحديديك ، حيث يقاس اللون على طول موجة ٥٢٠ nm .

الجواهر الكشافة :–

١ – كحول ايثايل مطلق وخالى من الألدهيد aldehyde - free .

٢ – زيلين .

٣ – جوهر α - α`– dipyridyl : – ١,٢٠ جم / لتر فى بروبانول عادى n - propanal .

٤ – محلول كلوريد حديديك : – ١.٢٠ جم كلوريد حديديك ($FeCl_3 , 6H_2O$) فى إيثانول ، ويحفظ فى زجاجات بنية .

٥ – محلول قياسى من DL - α - tocopherol : – ١٠ ملجم / لتر فى إيثانول .

التكنيك : –

١ – إلى ثلاث أنابيب طرد مركزى ذات غطاء زجاجى محكم ، يضاف على التوالى ١,٥ مل من السيرم ، أو ١,٥ مل محلول قياسى ، أو ١,٥ مل ماء (بلانك) . يضاف إلى الأنبوبة الأولى (test) والأخيرة (بلانك) ١,٥ مل ايثانول ، وإلى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الثانية التى تحتوى على المحلول القياسى (.st) يضاف ١,٥ مل ماء ، ثم يضاف إلى كل منها ١,٥ مل زيلين . تغلق الأنابيب جيداً ثم تخلط جيداً وتطرد مركزياً (على حوالى g ٣٠٠٠ لمدة ١٠ ق) .

٢ - يؤخذ ١,٠ مل من طبقة الزيلين من كل أنبوبة ويوضع فى أنبوبه بغطاء نظيفة (مع مراعاه عدم أخذ جزء من رواسب البروتين أو الأيثانول) .

٣ - يضاف لكل أنبوبة ١,٠ مل جوهر dipyridyl ، ثم تغلق جيداً وترج .

٤ - ينقل ١,٥ مل من المخلوط إلى cuvette ويقاس الأمتصاص لكل من الـ test والـ .st على طول موجة ٤٦٠ nm ضد البلانك وتسجل القراءات .

٥ - بداية بالبلانك يضاف ٠,٣٣ مل من جوهر كلوريد الحديديك ثم تخلط جيداً ويقاس الأمتصاص على طول موجة ٥٢٠ nm بعد ١,٥ ق من الخلط (A_{520}) لكل من الـ test والـ .st ضد البلانك .

الحساب : -

يحسب تركيز التوكوفيرولات فى السيرم من المعادلة التالية

$$\text{Serum tocopherols (mg / l)} = \frac{\grave{A} \text{ of test}}{\grave{A} \text{ of st}} \times 10$$

حيث أن : - $\grave{A} = A_{520} - 0.29 \times A_{460}$

تقدير التوكوفيرولات فى العينات الزيتيه (Pearson , 1976)

كما هو معروف أن فيتامين هـ ومشابهاته توجد فى الجزء الدهنى فى الأغذية ، وبالتحديد فى الجزء الغير متصبن منها . وقد استخدمت طريقة Emmerie & Engel (1939) لتقديره للأغراض الروتينية ، ولكن وجد أن بعض المواد مثل الكولستيرول والكاروتينيدات تتداخل فى التقدير . أما طريقة Dickes (1966) ، فقد حلت هذه المشكلة عن طريق فصل فيتامين هـ باستعمال تكنيك الـ TLC ثم بعد ذلك تطبيق تفاعل أمرى - أنجل ، والذى عن طريقها يتم تقدير كل من الألفا والبيتاتوكوفيرول سبكتروفوترمترياً . أما فى هذه

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الطريقة فتتم أكسده التوكوفيرولات بواسطة حمض النيتريـك إلـى تـوكـوكـوينون أحـمر red tocoquinone . وهذه الطريقة أكثر تخصصاً عن طريقة أمرى - أنجل ، ولكنها تحتاج إلى وقت أطول وكمية كبيرة من العينة فالتوكوفيرولات تتأكسد بسرعة فى وجود القلوى ولكنها تكون ثابتة فى الوسط الحامضى لذلك ففى هذه الطريقة يتم التصبن بواسطة حمض كبريتيك كحولى alcoholic H_2SO_4 .

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول حمض الكبريتيك الكحولى (1M) : - ويحضر بأضافة ٢,٨ مل من حمض الكبريتيك المركز (٩٥٪ = ٣٦ M) إلى حوالى ٥٠ مل أيثانول ثم يكمل إلى ١٠٠ مل ، مع مرعاه التبريد .

٢- حمض نيتريك مركز (AR) .

٣ - ايثير ثنائى الإيثايل .

٤ - كحول إيثايل مطلق .

٥ - كبريتات صوديوم لامائية .

التكنيك : -

١ - فى دورق سعة ١٠٠ مل مزود بمكثف عاكس reflux condenser توزن وزنة مناسبة بالضبط من الزيت (حوالى ١ جم) .

٢ - يضاف إليها ١٠ مل كحول مطلق و ٢٠ مل حمض كبريتك كحولى ، ثم يوضع المكثف العاكس ، وتلف كل الوحدة برقائق الألومنيوم alum.foil جيداً (لحمايتها من الضوء) ، ويتم التسخين فى حمام مائي لمدة ٤٥ ق وبعد ذلك تبرد .

٣ - يضاف ٥٠ مل ماء وتنقل المحتويات كمياً إلى قمع فصل زجاجى نفاذية الضوء خلاله قليلة low actinic (أو فى قمع عادى مغطى برقائق الألومنيوم) ، وتغسل محتويات الدورق بـ ٥٠ مل ماء إضافية للتأكد تمام النقل الكمى .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤ – تستخلص المواد الغير متصبنة بالايثير ٥ مرات وفى كل مره يستخدم ٣٠ مل أيثير ، وتجمع هذه المستخلصات فى وعاء معتم للضوء .

٥ – يغسل المستخلص الأيثيرى بالماء عده مرات حتى تمام التأكد بأنه لايحتوى على إى حموضه ، ثم يجفف بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائية .

٦ – يبخر المذيب على درجة حرارة منخفضة ، مع مرعاة عدم التعرض للضوء . ويمكن التخلص من الآثار النهائية من المذيب بواسطة تيار من النيتروجين ، ثم تذاب البقايا فى الحال وبسرعة فى ١٠ مل كحول مطلق .

٧ – يؤخذ حجم معلوم من المحلول فى دورق معيارى سعة ٢٠ مل ، وفى دوراق أخرى خاص بالـ standards تؤخذ حجوم مختلفة تحتوى على كميات معلومة بالضبط من فيتامين هـ (تركيزها بين ٠,٢ – ٢,٠ ملجم فيتامين هـ) وتكمل كلها إلى حجم ٥ مل بواسطة الكحول المطلق .

٨ – يضاف ١,٠ مل حمض نيتريك مركز (مرعاة الحرص الشديد عند أستعماله) ، وتوضع الدوراق فى حمام مائى على ٩٠° م لمدة ٣ ق بالضبط ، وهو الزمن اللازم لغليان الكحول .

٩ – تبرد الدوارق بسرعة تحت الماء الجارى ويضبط الحجم مرة أخرى إلى ٦ مل بالكحول المطلق ، ثم يقاس الامتصاص على طول موجه ٤٧٠ nm فى وجود بلانك يحتوى على ٥,٠ مل كحول مطلق و ١,٠ مل حمض نيتريك مركز معامل بنفس النمط .

١٠ – يحسب التركيز من المنحنى القياسى .

ملاحظات :-

يمكن تطبيق هذه الطريقة على عينات آخرى غير العينات الزيتية ولكن يفضل أولاً أستخلاص الزيت ثم تطبيق الطريقة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فيتامين ك - Vitamin K

$$\text{2-methyl-3-(3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecenyl)-1,4-naphthoquinone}$$

المركبات التي لها نشاط فيتامين ك هي عبارة عن استبدالات لمركبات ١ ,٤ نافثوكوينونات 1,4 naphoquinones ، وعلى ذلك فمعظم الخواص الكيميائية العامة لمجموعة فيتامين ك ترجع لهذا التركيب .

تفاعلاته :

يعتبر هذا الفيتامين ثابت للحرارة وللأكسدة ، ولكنه غير ثابت للعوامل التالية : – الحامض (القوى) والقلوى والضوء والاختزال .

الذوبان :

يذوب فى المذيبات العضوية (كلوروفورم ، بنزين ، كحولات) ، ولا يذوب فى الماء .

صوره :

يوجد فى صورة زيت أصفر ، والفيلوكوينون phylloquinone يوجد فى صورة زيت أيضاً على درجةحرارة الغرفة . ومن السهل بللورة المناكوينونات menaquinones المختلفة من المذيبات العضوية ، فهى ذات درجة أنصهار تراوح من ٣٥ الى ٦٠° م ، وذلك على حسب طول السلسلة الأيزوبرينية isoprenoid chain . أما فيتامين ك فله درجة انصهار = – ٢٠° م ، ووزن جزيئى = ٤٥٠,٧ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الخواص الطبيعية :

الصورة المؤكسدة لفيتامين ك تظهر امتصاصات فى الـ UV مثلما تظهرها نواه الألفانافثوكوينون α - naphthoquinone ، حيث تظهر ٤ امتصاصات (peaks) بين طول موجه٢٤٠ nm و ٢٨٠ nm وامتصاص غير حاد بين طول موجه ٣٢٠ - ٣٣٠ nm . ويتغير الامتصاص بدرجة كبيرة جداً عند أختزاله إلى هيدروكوينون ، ويختفى الـ peak الرئيسى الذى عند طول موجة ٢٧٠ nm . وتظهر أيضاً هذه المركبات خواص فى الـ IR و NMR متشابهة لما تحتوية من حلقة النافثوكوينون . وقد استخدم الـ MS فى تقدير طول السلسله الجانبية ودرجة التشبع فى مشابهات ومشتقات الفيتامين .

انتشاره وتوزيعه :

١- **وجوده فى النباتات** :- يوجد فى الفواكه مثل البرتقال والطماطم وفى الخضراوات مثل السبانخ والكرنب والألفا ألفا والقرنبيط وزيت فول الصويا ، وفى النقل والبذور ، ويوجد الفيلوكوينون فى الأوراق الخضراء .

٢ - **وجوده فى الحيوانات** :- يوجد فى كبد الخنزير والبيض واللبن ولحم السمك fish meat . ويعتبر لحم السمك مصدراً للانتاج التجارى لفيتامين ك . كما أن بعض الأنسجة الحيوانية مثل الكبد يوجد بها المناكوينونات .

٣ - **وجوده في الكائنات الحية الدقيقة** :- يوجد فى البكتريا المعوية intestinal bacteria ، كما يوجد المناكوينونات فى البكتريا أيضاً .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** :- من ١٠٠ - ٣٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم كما فى السبانخ وفول الصويا والقرنبيط والكرنب وكبد الخنزير وكبد البقر .

٢ - **المصادر المتوسطة** :- من ١٠ - ١٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم كما فى البطاطس والطماطم والألفا ألفا وصفار البيض وجنين القمح .

٣ - **المصادر المنخفضة** : - من صفر - ١٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم كما فى الذرة والجزر والبقدونس والبسلة واللبن .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الدور الطبى والغذائى :

١ - وحدات فيتامين ك : -

وحده دولية واحده IU = ٠,٠٠٠٨ ملجم مناديون menadion .

وحدتين من وحدات دام Dem unit = وحده واحدة من وحدات ansbacher unit

٢ - المقررات الموصى بها : -

فى الإنسان البالغ يتراوح المقرر الموصى به بين ٠,٥ و ١,٠ ميكروجرام فيتامين ك لكل كجم من وزن الجسم لكل يوم . وتزداد هذه المتطلبات للأطفال والرضع والحوامل . هذا والغذاء اليومى المتزن يحتوى على الكمية اللازمة للجسم .

٣ - اعطاء الفيتامين :-

يعطى فيتامين ك بالحقن فى الوريد (I .V) أو فى العضل (I. M) ، وأحياناً يعطى عن طريق الفم ، ولا يفضل إعطاءه موضعياً (على الجلد) .

٤ - أعراض النقص : -

وهى تشمل الأعراض الآتية : -

أنخفاض البروثرومبين فى الدم hypoprothrombinemia .

زيادة النزف hemorrhage and bleeding .

زيادة الزمن اللازم للتجلط clotting time .

نزف حديثى الولادة neonatal hemorrhage .

٥ - تأثير الجرعات العالية Over dose : -

عادة الجرعات العالية من فيتامين ك غير سامة nontoxic ولكن أحياناً تكون سامة إذا كانت كبيره جداً .

ففى الإنسان من المحتمل تتكون جلطة فى الوعاء الدموى thrombosis و قيىء vomiting وزيادة البورفورين فى البول porphyrinuria . أما فى الكلاب فيفرز الألبيومين فى البول albuminuria . وفى الفأر الصغير mouse يزداد الهيموجلوبين الحر فى الدم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

hemoglobinemia ، كما تظهر حاله cytopenia . وفى الأرنب يزداد الوقت اللازم للتجلط .

تحـليـل فيتـامين ك

١ - الفصل والاستخلاص :

يتم فصل فيتامين ك من المواد الحيوية التى تحتوية بالطرق القياسية المستعملة للحصول على الليبيدات النشطة حيوياً . ودائماً ما يكون الفصل صعباً خصوصاً لو كانت الماده المراد فصلها من المستخلص الأولى كانت قليلة . وعادة ما يتم عمل المستخلصات الأولية بأستعمال بعض أنواع من المذيبات النازعة للماء مثل كلوروفورم – ميثانول ، أو بطحن النسيج أولاً مع كبريتات صوديوم لامائية ثم استخلاصها بأسيتون ويتبعة استخلاص بهكسان أو أيثير. ويمكن استخلاص العينات الكبيرة (كميات بالكجم) من الأنسجة بالأسيتون فقط . ويفصل بين ماء وهكسان حتى نحصل على الفيتامين الخام . أما العينات الصغيرة مثل الأجزاء التحت خلوية فيمكن استخلاصها برج المعلق المائى مع مخلوط من الأيزوبروبانول وهكسان . ويمكن فصل الطبقتين عن بعضهما بالطرد المركزى ، ثم يتم تحليل الطبقة العليا مباشرة .

مستخلص المذيب غير القطبى الخام للأنسجة يحتوى على كميات كبيرة من ليبيدات متداخلة وكثيرة بالاضافة إلى الفيتامين المرغوب فيه . ويتم تسهيل عملية التنقية إلى مدى أبعد من ذلك . ويمكن فصل عدد من صور الفيتامين عن بعضها البعض وعن الليبيدات الأخرى عن طريق reversed phase partition chromatography . فالطرق العامة لاستخلاص الليبيدات تستخلص معظم صور فيتامين ك من الأنسجة . وعند أستخدام مذيب أكثر قطبية more polar يمكن استخلاص الصور الذائبة فى الماء من فيتامين ك water soluble forms من كل من مستخلصات الكبد والبكتريا .

وحيث أن فيتامين ك حساس للوسط القلوى ، فإنه يفضل الاستخلاص بالمذيبات مباشرة وبدون تصبن . وحيث أنه أيضاً يتلف بأشعاع الـ UV ، وعليه فلابد من تلافى تعرضه لضوء النهار العادى daylight أثناء تحليله . وعادة ما تجفف العينات النباتية قبل الاستخلاص بوضعها فى مجفف تحت تفريغ ، أو بالتجفيد ، ثم ترج المادة الجافة بقوة مع

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مذيب عضوى مثل الأيثير أو الأسيتون أو ايثيربترولى . وبالمثل تجفف الأنسجة الحيوانية قبل استخلاص المناكوينونات منها . وقد أستخدم الأسيتون والايثير لاستخلاص المناكوينون - ٤ من كبد البقر . كما أمكن فصل الفيلوكوينون من أغذية الأطفال ، برج العينات أولا مع الماء ثم اضافة حجم ايثانول مكافىء للماء ثم الاستخلاص بحجوم متعاقبة من الايثير والايثير البترولى. وعلى حسب طريقة الأستخلاص يتم تقدير كمية فيتامين ك الفعلية بلا تداخل مع الكيونونات الأخرى . ويمكن التغلب على هذه المشكلة بقياس الفرق بين صورة الفيتامين المؤكسده والمختزلة .

٢ - القياس اللونى : -

بعض التفاعلات اللونية تعتمد على وجود نواة النفثوكوينون والأخرى على الكوينونات . وهناك عدة تفاعلات لونية استخدمت فى تقدير فيتامين ك ، ولكن كلها تفتقر إلى التخصص . فتتفاعل الفيلوكوينونات والمناكوينونات مع ثنائى ايثايل ثنائى ثيوكربمات diethyldithicarbamate وفى وجود ايثوكسيد الصوديوم sod. ethoxide وتعطى لوناً أزرقاً والذى يبهت ببطء متحولاً إلى لون برتقالى محمر redish-orange . ويمكن أستخدام اللون الأزرق فى التقدير الكمى لهما . ويعرف هذا التفاعل باسم irreverre - sullivan test ، وهو حساس لحوالى ٤ ميكروجرام فيلوكوينون . وهذا التفاعل غير مناسب للمناديون ، ويمكن تقديرها كمياً بقياس اللون الأزرق على طول موجه ٥٧٥ nm والذى يتكون مع ethylacetonate فى وجود الأمونيا . وهذا التفاعل حساس لحوالى ٥ ميكروجرام مناديون لكل ميللتر . هذا، ويعطى كل من ثنائى أيثايل مالونات diethyl malonate والأسيتيل أسيتون acetylacetone نفس اللون مع المناديون . ويتفاعل المناديون مع القلويات ليكون لوناً أحمراً ذو أقصى أمتصاص بين طولى الموجه ٤٤٠ و ٤٥٠ nm ، والذى يمكن أستخدامه فى تقدير الفيتامين .

٣ - القياس الطيفى فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية :

كل من الفيلوكوينون والمناكوينونات والمناديون له امتصاص قوى فى الـ UV . فأطياف spectra الفيلوكوينون والمناكوينونات غالباً ما تكون متماثلة بين طول الموجة ٢٤٠ - ٢٨٠ nm والمناديون لها أمتصاص فى نفس المنطقة ولكنها تختلف فى مكان الأمتصاص .

ويلزم التخلص من المذيبات التى أستخدمت فى أستخلاص فيتامين ك من الأغذية

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

(والتى أستخلصت معها ليبيدات أخرى) قبل التقدير بالقياس الطيفى فى الـ UV . ويمكن التخلص من الليبيدات بعملية بللورة على درجة حرارة منخفضة باستعمال خليط مجمد من الأسيتون ثانى أكسيد الكربون الصلب أو بتمرير الليبيدات على أعمدة حمض سيليسيك silicic acid أو ألومينا متعادلة . وأستخدمت الألومينا الغير نشطة (٨٪ ماء) فى فصل الفيلوكوينون عن الليبيدات بالإحلال elution ببنزين متدرج فى التركيز من صفر -١٢ ٪ فى أيثير بترولى .

وتجرى عملية فصل قبل قياس الأمتصاص فى الـ UV ، ويتم ذلك على خطوتين على TLC سيليكاجيل . فيتم الجريات الأول بأستخدام رابع كلوريد الكربون ، والثانى باستخدام بنزين وفى نفس الأتجاه ، وأخيراً يقدر الفيلوكوينون على الـ spots التى على ألواح TLC .

وكل من الطرق اللونية والأسبكتروفوتومترية ذات أهمية (مفيدة) فى تقدير فيتامين ك فى المستخلصات التى تحتوى على كميات كبيرة منه ، مثل التى يحصل عليها من المزارع البكتيرية ، ولكن هذه الطرق ذات أهمية أقل عندما يتم تقدير الكمية الصغيرة من الفيتامين الموجودة فى معظم المصادر الطبيعية ، فهذه التقديرات تعتمد على التقدير الحيوى .

٤ - التحليل الكروماتوجرافى :

مع أن المواد النباتية تحتوى على فيتامين ك فى صورة فيلوكوينون phylloquinone ، فإن المصادر الحيوانية والبكتيرية غالباً ما تحتوى على مخلوطاً شاملاً لعديد من مشابهات الأيزوبرين isoprene analogs لمجموعة المناديون ، و فصل هذه الصور تم إنجازه على TLC مشبعة بكل من نترات الفضة والبرافين ، وهناك طرق كثيرة من الكروماتوجرافى تتضمن PC و TLC أخرى .

اجرى حديثاً بعض التعديلات المتقدمة فى فصل صور عديدة من فيتامين ك بطريقة توزيع التيار العكسى counter current distribution ، أو بطريقة كروماتوجرافى الطور البخارى vapor phase chromatography ، واستخدم GC فى تقدير فيتامين ك فى النباتات الخضراء وخلافها من المصادر . كل طرق فصل المشابهات تستلزم مستخلصات مركزة لفيتامين ك ، ويجب أن تتم فى ضوء خافت حتى لا تتلف الـ UV فيتامين ك . والمركبات التى لها نشاط فيتامين ك أيضاً حساسه للقلوى ولكنها نسبياً ثابتة للأكسدة الهوائية والحرارة ويمكن تقطيرها تحت تفريغ حتى يحدث أقل تلف لها . وأهمية تمثيل فيتامين ك فى الأنسجة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الحيوانية وخصوصاً التحولات الداخلية لفيتامين ك ، ومركب 2,3 epoxide الناتج من تمثيلها أمكن تأكيدها بأستعمال HPLC كأداة تحليليه لدراسة تمثيل فيتامين ك حيث استخدمت هذه الطريقة أولاً لفصل فيتامين ك ثم لتقديره . وكذلك تحول أيبوكسيد فيتامين ك سواء داخل أو خارج الكائن الحى (in vitro ، in vivo) إلى فيتامين ك . وهذه الطريقة قادرة على فصل صورة فيتامين ك المؤكسدة عن المختزله . وقد أمكن استعمالها فى دراسة الدور الجزيئى molecular role لفيتامين ك . وأستعملت هذه الطريقة أيضاً فى دراسة توزيع فيتامين ك فى الإنسان عند حقنه به ، وأيضاً لدراسة مدى تحوله turnover . وعند استخدام الـ HPLC أمكن فصل الصورتين cis و trans للفيلوكوينون وصور الفيتامين الأخرى (4- MQ عن MQ - 10) باستبدال العمود فى HPLC . وهذه الطريقة احسن بكثير جداً من الطرق الكروماتوجرافيه السابقة .

ومن أهم خواص فيتامين ك والكوينونات المشابهة : -

أ - تختزل بسهولة إلى هيدروكوينونات hydoquinones .

ب - سهولة إسترجاعها بواسطة الأكسدة . وهذه المركبات تعتبر حساسه sensitive (سريعة التأثر) عند التقدير .

ولذلك فالطرق الكروماتوجرافية تلعب دوراً هاماً فى التحليل . وعادة استخدم طريقة أو أكثر فى خطوات الفصل شىء ضرورى ولابد منه ، وذلك لوجود نقص فى طرق التقدير المتخصصه ، وعليه يجب التوسع فى استخدام الطرق الكروماتوجرافية المختلفة (Pc ، GLC ، TLC .... etc) ، وخصوصاً الـ TLC .

ونظراً لكثرة مركبات الكوينونات بالأضافة الى أنواع فيتامين ك المختلفة ، فقد تم وضع رموز مختصرة abbreviation لهذه المركبات بواسطة IUPAC ، والجدول التالى يوضحها :-

حيث أن : - n = عدد وحدات الأيزوبرين (المشبعة أو الغير مشبعه) على السلسله الجانبية .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Trivial Name	Suggestion	Abbreviations
Vitamin K_1	Phylloquinone	K (K-4)
Vitamin K_2	Menaquinone - n	MK - n
Vitamin K_3	Menadione	
Plastoquinones Ubiquinones.	Plastoquinone-n	PQ - n
Coenzyme Q	Ubiquinone - n	Q - n
α - Tocopheryl quinone	α - Tocopheryl quinone	α - TQ

٥ - الطرق الحيوية :

الطرق العادية لتقدير كمية فيتامين ك حيوياً فى مصدر مجهول تعتمد على تقدير الزمن اللازم لتجلط الدم whole blood clotting فى الدجاج . ويتم فيها أستنزاف فيتامين ك من جسم الدجاج الصغير بالتغذية على علائق خالية من الفيتامين حتى يصبح الزمن اللازم لتجلط الدم ٤ - ٧ مرات ضعف ما يلزم لتجلط الدم الطبيعى . ويتم التقدير بعد اضافة Ca^{++} وثرومبوبلاستين مخ الدجاج brain thromboplastin إلى الدم المضاف إليه سترات citrated blood . والمواد المراد تقدير الفيتامين فيها توضع داخل أقراص مع سكر مطحون جيداً وتمرر خلال المرىء esophagus باستعمال مقبض crop مناسب . يعاد تقدير زمن التجلط بعد ٢٠ ساعة (إى يقدر قبل أعطاء القرص وبعده بعشرين ساعة) .

وتقارن أستجابة هذه المعاملة مع أستجابة كميات معلومة من فيتامين ك . هذا ، فإذا توافرات كميات كبيرة من الماده المراد تقدير الفيتامين فيها، فيمكن أن تضاف إلى علائق خالية من فيتامين ك وتغذى بها الحيوانات (دجاج) لمدة اكبر من اسبوعين .

تقارن الأزمنة اللازمة لتجلط لدم مع تلك التى تعطى كميات معلومه من فيتامين ك ألا وهى الـ standard . هذا ، فالبرغم من أن تقدير التجلط clotting assay مازالت تستعمل ، إلا أنها جزئياً غير حساسة ، وهى إلى حدأماحيوية bioassay . وتستعمل طرق أكثر قياسية من تلك ، وهى قياس الأزمنة اللازمة لتجلط البلازما على مرحلة واحدة one stage plasma clotting times أو الطريقة المعدلة لها ، وتلك الطرق قياسية أكثر من الطرق التى تستعمل الدم الكلى whole blood .

درجة الحساسية لكلا الطريقتين تعتمد على ظروف التقدير نفسها والمصدر وطريقة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحضير الثرومبوبلاستين المحضر والمستعمل فى القياس . وتم تطوير هذا الاساس بأحداث حاله أنخفاض البروثرومبين فى الدم hypoprothrombinemia بالتغذية على مشتقات الكيومارين coumarin . وهى مواد مانعة لتجلط الدم anticoagulant . وتلك أفضل من التغذية على علائق خالية من فيتامين ك . هذا التعديل المطور لطريقة التقدير الحيوية الأساسية تبخس النشاط الحيوى للمناديون ومشتقاته الكيميائية بدرجة كبيرة (تثبطه) فى الحيوانات الطبيعية . والتقدير الحيوى القياسى تم تعديله أيضاً بإضافة مستحضرات السلفا الطبية sulfa drugs إلى العلائق الغذائية ، وهذا التغيير يقلل إى مشاركة لإى فيتامين ك الذى يخلق معوياً ، وبذلك تزداد حساسية التقدير .

الدجاج من أحسن الأجناس المفضلة لظهور حالة نقص فيتامين ك لأن متطلباتها من فيتامين ك نسبياً عالية ، وفيتامين ك المأخوذ عن طريق via coprophagy لا تشكل أى مشكلة. ولكن ظهور نفس الحالة فى الثدييات الصغيرة يكون صعباً .

كل الطرق الحيوية التى يتطلب فيهاأخذ المواد عن طريق الفم oral assay ، تتعقد وتزداد صعوبتها بتأثير المعدلات المختلفة وطول أو أتساع مدى الامتصاص (من الأمعاء) المرغوب فيه من النواتج المختلفة له تأثير أيضاً على القياس . فعندما تتيسر مستحضرات أكثر نقاوة ، فأنه يمكن اعطائها عن طريق الحقن فى الوريد . والدجاج المصاب بحالة نقص البروثرومين فى الدم hypoprothrombinemia حساس بعض الشيء للنزف hemorrhage وذلك نتيجة لرقة الشعيرات الدموية .

وأمكن استعمال فئران مصابة بنقص فيتامين ك لتقدير النشاط الحيوى لهذا لفيتامين. فتغذى الفئران على علائق خالية من فيتامين ك لمدة أسبوعين ، وذلك لتقليل مستويات البروثرومبين إلى حوالى ٤٠٪ عن الطبيعى ، وتحقن الصور المختلفة من فيتامين ك فى قلب الحيوان interacardially ، وتقدر الاستجابة بعد ١٨ ساعة . فى هذه الطريقة ١٠ مول mol من الفيلوكوينون تعطى أقصى استجابة . وهذه الطريقة تستخدم فقط لو توافرت صور نقية نسبياً من الفيتامين .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الاختبار اللونى لفيتامين ك

(Stroev and Makarova , 1989) (Naphthoquinone)

يتفاعل فيتامين ك مع diethyldithiocarbamate فى الوسط القلوى ويعطى معقد ذو لون أزرق .

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول فيتامين ك مشبع فى كحول ايثايل ٧٠٪ .

٢ - محلول sodium diethyldithiocarbamate (DDC) (٢ ٪ فى كحول) .

٣ - محلول هيدروكسيد صوديوم كحولى (٤ ٪ فى كحول) .

التكنيك : -

١ - فى أنبوبة أختبار جافه ، يضاف ٤ نقط من محلول فيتامين ك ، ثم يضاف إليها ٨ نقط من محلول sodium diethyldithiocarbamate ، وأخيراً ٤ نقط محلول هيدروكسيد الصوديوم الكحولى .

٢ - ترج محتويات الأنبوبة جيد ويلاحظ تكون اللون الأزرق .

تقدير فيتامين ك بالطريقة اللونية (Gyorgy and Rubin , 1950)

يتفاعل فيتامين ك مع sodium diethyldithiocarbamate (DDC) وكحولات صوديوم ويتكون لون أزرق كوبلتى غامق ، وأستغل هذا التفاعل لتقدير فيتامين ك لونياً.

الجواهر الكشافة : -

١ - كحول إيثايل ٩٥ ٪ .

٢ - sodium alcoholate : - ويحضر بإذابة ٢ جم صوديوم فى ١٠٠ مل ايثانول ٩٥٪ .

٣ - محلول DDC (٥٪ فى أيثانول ٩٥٪) :- لو كانت ماده sodium diethyl dithiocarbamate غير نقيه ، فلابد من أعاده بللورتها فى أيثانول ٩٥٪ دافىء مع إزالة اللون بواسطة carbaraffin ، ولابد ان يكون محلول DDC فى الأيثانول

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

عديم اللون ويستعمل طازجاً ولايحفظ لأكثر من يوم واحد.

٤ - محلول فيتامين ك نقى (٠,٥ ملجم / مل) .

التكنيك : -

١ - فى أنبوبة جافة نظيفة ، يوضع ٢ مل من محلول الأيثانول ٩٥٪ والذى يحتوى على الماده المختبره (تذاب وزنه معلومه بالضبط من المادة فى حجم معين من الكحول)، ثم يضاف ٢ مل محلول DDC ، وأخيراً ١,٠ مل جوهر كحولات الصوديوم .

٢ - فى هذه الظروف يتكون لون أزرق كوبلتى غامض deep cobalt blue والذى تصل شده كثافته بعد ٥ ق ، ثم يقل تدريجياً بعد ٨ ق .

٣ - يقاس اللون فى جهاز قياسى الألوان فى وجود فلتر أخضر مناسب ، و فى وجود البلانك (بدون فيتامين) .

٤ - تحضر عده أنابيب تحتوى على المحاليل القياسية تتراوح بين تركيز ٠,٠١ ملجم / ٢ مل ، و ١,٠ ملجم / ٢ مل فى كحول أيثايل . وتجرى عليها نفس التفاعل وبنفسى الطريقة التى أجريت على العينة ، ومنها يرسم المنحنى القياسى . وحيث أن اللون ثابت لعده دقائق قليلة فلابد أن تؤخذ القراءات كل دقيقة ولمده ١٠ ق من بعد أضافة آخر جوهر ، وتستعمل أكبر قراءات . ومما هو جدير بالذكر ، إنه على التركيزات المنخفضة يكون اللون أكثر ثباتاً عنه على التركيزات المرتفعة .

٥ - يحسب تركيز الفيتامين فى العينة من خلال المنحنى القياسى .

تقدير فيتامين ك بالطرق الكروماتوجرافية : -

نظراً لصعوبة تقدير فيتامين ك بالطرق اللونية ، فقد أستخدمت الآن الطرق الكروماتوجرافية الحديثة لتقديره ، وسلسله كتب Chromatographic Science أهتمت بهذا الموضوع ونشرت عدداً خاصاً لتقدير الفيتامينات بالطرق الكروماتوجرافية (De Leenheer and De Ruyter , 1985).

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Vit . B_1 (Thiamine) -(الثيامين) فيتامين ب١

يلعب فيتامين ب دوراً كبيراً فى عمليات التمثيل الغذائى فى جميع الخلايا الحية فى صوره معاون أنزيمى لكثير من الأنزيمات ، وصوره كمعاون أنزيمى تشمل الثيامين أحادى الفوسفات (TMP) ، وثنائى الفوسفات (TDP) ، والثلاثى الفوسفات (TTP) . وشكل (٣١) يعرض التركيب الكيميائي للثيامين وصوره كمعادن أنزيمى .

الثيامين هيدروكلوريد عباره عن بللورات عديمه اللون وهى عاده hemihydrate ولها رائحة مميزه جداً وذات طعم مر bitter taste ، تذوب فى الماء بدرجة كبيرة جداً . يذوب جزئياً فى الكحول والأسيتون ، وغير ذائب فى الأيثير والبنزين والهكسان و الكلوروفورم ومذيبات الدهون الأخرى .

بللورات الكلوريد (هيدروكلوريد) المحضره من الكحول و الماء أو من الأسيتون والماء تكون hemihydrate . وعند تركها فى الهواء الجوى فأنها تمتص الماء بحيث يصبح جزىء ماء لكل جزىء (مول / مول) . ويمكن التخلص من الماء بالتسخين حتى ١٠٠° م أو تحت تفريغ باستعمال H_2SO_4 أو P_2O_5 . والفيتامين ثابت فى الصورة الجافة ويتحمل حتى ١٠٠ ° م . المحلول المائى ٥٪ منه (لصورة الهيدروكلوريد) له p^H حوالى ٣,٥ . الصوره أحادية النترات mononitrate لهاp^H = ٦,٥ - ٧,١ . المحاليل المائية ثابته للحراره على درجة p^H أقل ٥,٥ (حتى فى الأتوكلاف) وثابته للأكسده .أما على p^H أعلى من ٥ ، فإنه يتلف

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Thiamin and its coenzyme forms.
a. Thiamin (free base) with the ring atoms numbered; b. Thiamin monophosphate, TMP; c. Thiamin diphosphate, TDP; d. Thiamin triphosphate, TTP

شكل (٣١) التركيب الكيميائى للثيامين وصورة كمعاون أنزيمى
(a) الثيامين .
(b) الثيامين أحادى الفوسفات TMP .
(c) الثيامين ثنائى الفوسفات TDP .
(d) الثيامين ثلاثى الفوسفات TTP .

بسرعة نسبياً بالتعقيم فى الأتوكلاف ، وعلى pH = ٧ أو أعلى فإنه يتلف بالحرارة أو حتى فى الجو العادى . وعند معاملة الفيتامين بأيدروكسيد الصوديوم والأكسجين ، تتكون مركبات عديدة أهمها الثيامين ثيول والثيامين ثنائى الكبريتيد والثيوكروم . وشكل (٣٢) يوضح التركيب الكيميائى لهذه النواتج .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Some products of treatment of thiamin with sodium hydroxide and oxygen

a. Thiamin thiol; b. Thiamin disulfide; c. Thiochrome

شكل (٣٢) نواتج معاملة الثيامين بأيدروكسيد الصوديوم والأكسجين

تفاعلاته :

هذا الفيتامين يتأثر بالحرارة والوسط القلوى والعوامل المؤكسدة والمختزلة وبالضوء UV ، وعلى ذلك فكل هذه العوامل تتلفه ، ولكنه ثابت فى الوسط الحامضى .

الذوبان :

يذوب فى الماء (١ جم / ١ مل ماء) ، وفى المحاليل الكحولية ، ولايذوب فى المذيبات الغير قطبية مثل البنزين والكلوروفورم والإيثير .

صوره :

الصورة النقية منه بللورية بيضاء .

خواصه :

الوزن الجزيئى ٣٣٧,٣(كهيدروكلوريد) ، درجة انصهاره MP = ٢٤٤°م ، يوجد فى صورة ملح أحماض mononitrate (قاعدة عضوية) . المجموعات الهامة للنشاط هى : - C_2 of thiazole وC_2 of Pyrimidine و OH . وهو غير نشط ضوئياً .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أنتشاره ومصادره :

١ - **وجوده فى النباتات** :- كل الفواكه بها كمية قليلة من الثيامين ماعدا عنب الثعلب gooseberries والبرقوق pluns فيوجد فيها كميه متوسطه من الفيتامين . وكل الخضروات بها كمية قليلة أيضاً عدا البقول . والخضروات التى تؤكل أوراقها والذرة والبسلة والبطاطس والقرنبيط فيوجد فيها كميات متوسطة من الفيتامين. كل النقل بها كميات متوسطة منه عدا جوز الهند coconut فيوجد فيه كمية صغيرة. وكل الحبوب grains يوجد فيها كميات متوسطة عدا غلاف الحبوب والنخالة وجنين القمح ونواتج تبيض الأرز فيوجد فيها كميات كبيرة .

٢ - **وجوده فى الحيوانات** : كل الحيوانات بها كميات متوسطة من الثيامين عدا لحم الخنزير فيوجد به كمية كبيرة . وبعض الأسماك يوجد بها كميات صغيرة منه.

٣ - **وجوده فى الكائنات الحية الدقيقة** :- الخميرة (الغير حية killed) ، وفى المشروم (عش الغراب) mushrooms فيوجد فيها كميات متوسطة .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** :- من ١٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠ لكل ١٠٠ جم كما فى جنين القمح و نخالة الأرز ودقيق فول الصويا والخميرة ولحم فخذ الخنزير المملح ham.

٢ - **المصادر المتوسطة** :- من ١٠٠ إلى ١٠٠٠ لكل ١٠٠ جم كما فى عنب الثعلب والبرقوق الجاف والخوخ والأسبراجس والبقول (بأنواعها) والقرنبيط والذرة والبطاطس والشعير والفول السودانى ولحم وأعضاء البقر والدجاج والخنزير والرومى والعجول ، وفى البيض واللبن والحوت والسالمون والماكريل وسمك الشبوط carp .

٣ - **المصادر القليلة** :- من ١٠ إلى ١٠٠ ميكروجرام لكل ١٠٠ جم كما فى التفاح والموز والفراولة والأنواع المختلفة من البطيخ والكريز والجريب فروت والليمون والبرتقال ، وفى الكرنب والخس والأبصال واللفت والسبانخ والبطاطا ، وفى الرنجة والتونا ...... إلخ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الدور الطبى والغذائى :

١ - وحدات فيتامين ب١ : -

وحده دولية واحده = ٣ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد .

= وحده واحده من وحدات usp .

٢ - المستويات الطبيعية فى الدم : -

فى الذكور : - 1.3 µg / 100 free base in serum

3.11 µg / 100 carboxylase in blood cells

٣ - المقررات الموصى بها : -

للأطفال :- من ٠,٦ إلى ١,١ ملجم / يوم .

للبالغين : - ١,٠ ملجم / يوم للإناث و ١,٤ ملجم / يوم للذكور .

حالات خاصة :- تزداد المتطلبات فى الحمل والرضاعة وذلك تبعاً لوزن الجسم والسعرات المأخوذة والتخليق المعوى والأمتصاص .

٤ - إعطاء الفيتامين : -

يعطى عن طريق الحقن (I.V و I.P) ، والطريق المفضل لأعطاءه هو عن طريق الفم .

٥ - أعراض النقص :

أ) فى الإنسان : -

تظهر أعراض كثيرة وهى تشمل مايلى : - البرى برى beri beri ، فقدان الحس anesthesia ، فرط الحساسية hyperesthesia ، تأخير النمو retarded growth ، انحلال الخلايا العصبية neuron degeneration ، فقد الوزن weight loss ، تعب fatigue ، نقص أكسجين الأنسجة anoxia ، كثرة الشكوى من الجهاز الهضمى، ضعف weakness ، فقد الأنعكاسات اللاأرادية loss of reflexes ، احساس أهتزازى vibratory sense ، تأثير على القلب والجهاز الدورى circulatory and cardiac involvement ، أضطرابات عقلية mental disturbances ، فقد الذاكرة (نسيان) memory loss ، سرعة الغضب

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

irritability ، ضمـور عضلى فى الأطراف muscular atrophy in exlremities ، زيـاده بيروفات ولاكتات الدم increesed blood pyruvate and lactate .

ب) فى الحيوانات المعملية : -

زيادة الدهون المختـزنه ، زياده درجـة حـرارة الجـسم ، اضطرابات عـصـبـيـة polyneuritis ، التهاب الأعصاب ، مرض فى الصحة والصوت tone ، أوديما edema ، بطء القلب bradycardia ، تضـخم فى القلب cardiac enlargement ، خلل فى العين (فى الدجاج والرومى) opiosthotones.

تحليل الثيامين

١ - فصل وتقدير الثيامين :

على درجه p^H = ٨ أو أعلى ، يتحـول الثيامين إلى اللون الأصـفر ويتلف بسلسلة من التفاعـلات المعقـده وغير العكسـية فى الوسط القلوى القوى فى وجود عوامل مؤكسدة مثل cyanogen bromide, $HgCl_2$ & $[Fe(CN)_6]^{3-}$ ، وغيرها ، و يتحول الثيامين إلى ثيوكروم thiochrome والذى له خاصية فلورة زرقاء blue fluorescence والتى يستفاد منها فى تقدير الفيتامين . والثيامين يعطى عديد من التفاعلات اللونية مثل اللون الوردى pink مع، diazolized sulfanilic acid ولون أحـمـر أرجـوانى red purpl مـع -diazolized p aminoacetophenone ، وراسب أحـمـر برتقالى orang red مع potassium bismuth iodide ، وكل من picrolonic acid , gold choloride , mercuric choloride , I_2 تعطى رواسب ملونة مع الثيامين .

ويترسب الثيامين مع التانينات tannins ومع عـديد من القلويدات alkaloids ، ومـع حمض البكريك picric acid , quinine , strychnine ومع iron amm . citrate . ويتكسر بسرعة بالمعامله بالكبريتيت sulfite عند الـ methelene bridge إلى ثيازول وبريميدين على درجة p^H ٦ أو أعلى . وعلى درجة p^H أقل من ٥ يقل معدل التلف بدرجة كبيرة . وعلى درجة p^H =٥ يعطى الثيامين أقصى أمتصاص عند طول موجه ٢٦٧ و ٢٣٥ nm. ودرجةالأمتصاص تعتمد على درجة الـ p^H ، فمثلاً على درجة p^H أقل من ٣ يعطى أمتصاص واحد عند طول موجه ٢٤٧ nm .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وقد عرف منذ عام ١٩٣٥ إن أكسده الثيامين بالفرى سيانيد ferricyanide فى الوسط القلوى alkaline oxidation تعطى ناتج له فلورة زرقاء كثيفة ، وقد سمى بالثيوكروم . thiochrome

وقد عدلت هذه الطريقة كثيراً . ولكن مازالت حتى الآن تستخدم بكثرة فى تقدير الثيامين فى الأغذية والمستحضرات الطبية والمواد الأخرى . وهى أساس الطريقة الرسمية لتقديره .

أ –طرق الفصل Isolation procedures : -

تم فصل الثيامين من المصادر الطبيعية natural sources مثل نخالة الأرز rice bran و مستخلصات الخميره yeast extracts ، أو من جنين القمح wheat germ . وأساس الفصل يعتمد على أنه يدمص على بعض المواد مثل fuller's earth و مستحضر alum silicate مائى. وهذا الأساس يستخدم لفصل الثيامين عن المواد المصاحبة والمتداخله معه من المستخلصات الكلية والمعقدة للأنسجة الحيوانية والنباتية أستعداداً لتقديرها سبكتروفوتومترياً أو فلورومترياً .

فالثيامين فى الصورة الكاتيونية cationic form يدمص على المواد النشطة التالية Permutit-T أو Thiochrome Decalso .أما المواد الآنيونية والغير آيونية anionic & nonionic substances فتمر خلال العمود دون أدمصاص ، ثم يتم أحلال الثيامين elutiبأستعمال محلول كلوريد بوتاسيوم محمض ساخن hot acidic KCl وتم فصل الثيامين وأستراته الفوسفاتية وبعض مشابهاته بأستعمال طرق متعددة من كروماتوجرافى الأعمده بأستعمال مبادل كاتيونى ضعيف weak cation exchanger مع غسيل متدرج gradient elution أو مبادل كاتيونى قوى مثل Dowex 1× 8 باستعمال عمودين وراء بعضهما أوفى عمود واحد ويمكن استعمال Dowex 2 × 8 ومحلول أحلال مكـــون من fonnic acid (M ٠,٠١) متبوع بمحلول فورمات صوديوم (M ٠,٥) . كما أمكن فصل الثيامين أيضاً بطريقة ممتازه بأستعمال طرق الكروماتوجرافى على ورق ترشيح واتمان رقم ١ مع أستعمال مخلوط مكون من n- propanol : محلول خلات منظم (p^H = ٥ ، تركيزه ١ M) : ماء ، بنسبة ٧٠ : ٢٠ : ١٠ . أو بأستعمال ورق Munktell #00 مع أستعمال مخلوط مكون من n-propanol : محلول خلات منظم (p^H = ٤,٥ ، تركيزه ٠,٥ M) بنسبة ٦٠ : ٤٠.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وأخـــيراً أمكـــن فصـــل الثيامين وإستراته وفصل فوسفات الثيامين عن فوسفاتات النيوكليوتيد nucleotide phosphate بأســتـعـمـال ورق واتمان رقم ١ ومــذيب مكون من isobutyric acid : (M1) NH_4 OH : (M1) EDTA : بنسبة ١٠٠ : ٦٠ : ١,٦ وكانت قيم R_f بهذه الطريقة هى ٠,٨٧ للثيامين و ٠,٦٨ للثيامين ثنائى الفوسفات و ٠,٧٧ للثيامين أحادى الفوسفات و ٠,٥٥ للثيامين ثلاثى الفوسفات .

وتم فصل الثيامين عن استراته ، وفصل الثيازول thiazole ، وفوسفات الثيازول thiazole phosphate على ورق واتمان رقم ١ بأستعمال مخلوط مكون من n - propanol : محلول خلات تنظم (p^H = ٥ ، ١ M) : ماء ، بنسبة ٧٠ : ١٠ : ٢٠ . وأيضاً تم الفصل على ورق واتمان 3MM باستعمال إى من المذيبين التاليين : n-propanol : NH_4OH مركزة : NaH_2PO_4 (٠,١ N) :ماء ، بنسبة ١٩٨ :٣ :٤٠ : ٥٨ ، أو n-propanol : ماء : محلول خلات منظم (p^H = ٥ ، ١ M) ، بنسبة ١:٣:٧ . وكانت قيم الـ R_F للمذيب الأول هى ٠,٨٤ للثيامين هيدروكلوريد و ٠,٧٠ للثيامين أحادى الفوسفات و٠,٥٤ للثيامين ثنائى الفوسفات ، للمذيب الثانى ٠,٦٠ للثيامين هيدروكلوريد و ٠,٢٧ للثيامين أحادى الفوسفات و٠,٠٦ للثيامين ثنائى الفوسفات .

تم أستخدام الـ TLC أيضاً لفصل الثيامين واستراته ونواتجه على ألواح من السيليكاجيل (silica gel G) باستعمال مذيبات مختلفة . وهذه الطريقة أحسن لأنها تستعمل كميات صغيرة من الماده تحت الدراسة ،كما أنها أسرع وأدق .

تم أستخدام الألكتروفوريسيس لفصل الثيامين واستراته الفوسفاتيه ، واستخدام فى هذا التكنيك ورق Munktell 20 فى محلول خلات منظم (p^H = ٥,٤٤ ، ٠,٥ M) ، و فيها يجرى الثيامين واستر أحادى الفوسفات إلى القطب السالب(-) negative أما فوسفات ثنائى وثلاثى الثيامين فتجرى إلى القطب الموجب (+) positive ، وفصلهم كان ممتازاً .

وتم استخدام تكنيك الألكتروفوريسيس باستعمال عمود معباً بمسحوق السليلوز وأستعمال محلول ammonium formate (p^H = ٥,١ ، ٠,٠٥ M) كمذيب . وأخيراً فى السنوات الأخيرة تم فصل الثيامين واستراته ومشابهاته بالـ HPLC.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ب - طرق الاستخلاص Extraction procedures :

يوجد الثيامين أساساً فى الأنسجة الحيوانية فى صورة استرات الفوسفات ، فحوالى ٨٠٪ يوجد فى صورة ثنائى الفوسفات diphosphate وكمية بسيطة فقط traces توجد فى صورة أحادى الفوسفات monophosphate وثيامين حر . وحوالى ١٠٪ توجد فى صورة ثلاثى الفوسفات triphosphate . أما فى النباتات فيوجد الجزء الأكبر منه فى صورة ثيامين حر . وفى كلا الحالتين يوجد الجزء الهام من الثيامين مرتبطاً بالبروتين protein bound ، وعلى ذلك فإن طرق الأستخلاص يجب أن تصمم على أساس أنه فى صورة حرة وأخرى مرتبطة بالبروتين .

وعند الاستخلاص تؤخذ عينة مناسبة من الماده الصلبة أو السائلة تحت الدراسة ، وتطحن وتخلط جيداً homogenize فى محلول HCl (٠,١ N) مقدار حجمه حوالى ١٠ - ١٥ مرة من الوزنة المأخوذة من العينة . ويسخن المخلوط بالبخار steam أو على حمام مائى يغلى لمدة ٦٠ ق . ويجب أضافة حامض أضافى لو كانت درجة الـ p^H لنواتج الغسيل أثناء الأستخلاص أكبر من ٢,٠ .

ولتقدير الثيامين الكلى يعادل بعد ذلك المستخلص إلى درجة p^H = ٤,٥ (عادة تتم بواسطة خلات صوديوم) ثم تعامل بمستحضر أنزيمى يحتوى على الفوسفاتير phosphatase (مثل Takediastase أو Diastase أو Polidase أو Mutase أو Clarase)، وتحضن لمده ٤-٥ ساعات على ٤٠ - ٥٠°م لتحليل استرات الفوسفات . وبالرغم من ذلك فإن استرات الفوسفات تكون أيضاً ثيوكروم وفوسفاتات الثيوكروم thiochrome - phosphates لا تذوب فى الأيزوبيوتانول isobutanol وعليه فهى لا تستخلص ولاتقدركل الفيتامين . ولو كان المطلوب تقدير الثيامين الحر فقط فإن خطوة المعاملة الأنزيمية تستبعد . والمعاملة الأنزيمية للمواد النباتية أيضاً تؤدى إلى تحليل مائى للنشا بكمية زائده ، ويمكن استعمال الطرد المركزى أو الترشيح لفصل المستخلص عن المواد الغير ذائبة .

جـ - تنقية إضافية Further purification :

فى معظم المواد البيولوجية المعقدة ، من الضرورى تطبيق معاملة أضافية للتخلص من المواد المتداخلة interfering ، وفيها يوضع حجم مناسب من المستخلص فى عمود مبادل آيونى ion exchanger مجهز ومغسول (سيليكات ألومنيوم aluminum silicate) ، ثم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يغسل العمود بعد ذلك عده مرات بماء مقطر ساخن حتى تأخذ معها كل المواد الملوثة impurities ، ثم يتبع ذلك بإحلال elution الثيامين بـ ٢٥ مل من محلول ٢٥ ٪ KCl فى HCl(١,٠ N) ساخن مرتين أو ثلاث مرات ، ثم يضبط حجم المحلول النهائى إلى حجم معين (عادة ما يكون ٥٠ مل) .

د - تكوين الثيوكروم وقياس الفلورة :

الجواهر الكشافة : -

١) محلول فرى سيانيد القلوى : - يؤخذ ٣ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد $K_3 Fe (CN)_6$ (١ ٪)، و تخفف إلى ١٠٠ مل بمحلول NaOH ١٥ ٪ ، ويستعمل هذا المحلول حديث التحضير .

٢) محلول NaOH ١٥ ٪ .

٣) أيزوبيوتانول خالى فى الفلورة .

الطريقة : -

١ - يؤخذ حجمان مناسبان و متساويان من المحلول السابق (مستخلص الفيتامين) فى أنبوبتين اختبار .

٢ - يضاف إلى الأولى ٣ مل محلول الفرى سيانيد القلوى مع الرج بطريقة فعالة .

٣ - يضاف إلى الثانية (بلانك Blank) ٣ مل من محلول NaOH .

٤ - يستخلص كل منهما بـ ١٥ مل أيزوبيوتانول بقوة (الرج بشدة) .

٥ - يتم الطرد المركزى ، ثم تؤخذ طبقة الأيزوبيوتانول الصافية .

٦ - وحتى تصبح الطبقة الكحولية خالية من الماء (جافة) وصافية ، ترج هذه الطبقة مع كبريتات صوديوم جافة .

٧ - تقرأ الفلورة فى طبقة الكحول فى جهاز photofluorometer أو spectrophotofluorometer على طول موجة اثارة ٣٦٥ nm وطول موجة انبعاث ٤٣٦ nm .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٨ – تتم أحياناً المعايرة بكوينين قياسي معروف known quinine standard ، ولكن لابد من أجراء نفس الخطوات بأستعمال ثيامين قياسي للمقارنة .

هذا وقد وجد بعض العلماء إن كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ أو بروميد السيانوجين cyanogen bromide ، أفضل من الفرى سيانيد كعامل اكسدة oxidant فى تحول الثيامين إلى ثيوكروم . وهناك بعض التعديلات ومنها اضافة H_2O_2 قبل قياس الفلورة للتخلص من الفرى سيانيد الزائد .

ويمكن تقدير كل من الثيامين و hydroxyethylthiamin و pyrithiamin فى نفس العينة بأختبار مناسب لكل من ظروف الأكسدة وأطوال الاثارة والانبعاث الموجية . هذا ، وفلورة الثيوكروم والبيريكروم pyrichrome تزاداد بشده فى وجود الكحول وعلى ذلك فإن الأستخلاص بالأيزوبيوتانول له غرضين مهمين و هما : –

١ – فصل الثيوكروم عن المواد المتداخلة .

٢ – زياده حساسية التقدير .

هـ – طرق أخرى :

يمكن تقدير الثيامين سبكتروفوتومترياً بقياس الامتصاص فى الـ UV على طول موجة ٢٦٦ nm . ولكن هذا ملائم فقط فى عدم وجود مواد أخرى لها امتصاص على نفس الطول الموجى مثل الأحماض النووية (لها امتصاص قوى عند طول موجة ٢٦٥ nm) .

والطريقتان الأسبكتروفوتومترية واللونية معاً يعتمدا على إنتاج أمين عطرى مع الثيامين كما يلى : –

. p - aminoacetophenone $\longleftarrow$ Diazo

وهذه الطريقة أقل فى حساسيتها بكثير جداً عن طرق فلورة الثيوكروم ، ولذلك فهى لا تستخدم بتوسع واستخدامها محدود بعض الشيء .

٢ – الطرق الحيوية Bioassay Procedures :

أ – باستعمال الحيوانات Using animals : –

إن أول طرق تقدير الثيامين حيوياً وكذلك الأبحاث المتعلقة بفصله وتنقيته ، كانت

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تستعمل الدجاج والحمام pigeons ، rice birds . وحيث أن هناك علاقة بين الثيامين وتمثيل البيروفات ، لذلك أستعمل هذا دليلاً على كميته . وأستعمل أيضاً كل من قياس معدل النمو فى الفئران أو relief brady cardia لتقدير الثيامين المتاح . وهذه الطرق تعانى من تغيرات كبيرة وتتطلب كميات كبيرة نسبياً من المادة تحت الدراسة وإلى مده طويلة .

ب - التقديرات الميكروبيولوجية Microbiological assays : -

أنواع عديدة من الكائنات الحية الدقيقة تتطلب الثيامين لنموها وتكاثرها ، ومن أهم هذه الانواع L. viridescens ، L.fermenti وغيرهما . والبعض منها ليس متخصصاً فعلا حيث أنها تستجيب للثيازول وبريميدين كبادئات precursors جيدة للثيامين . وكلا النوعين السابقين يستخدما بكثرة لهذا التقدير لأنهما يستجيبان فعلاً للثيامين فقط.

والتقدير الميكروبيولوجى سهل ، وحساس جداً (يكشف به عن ٥ - ٥٠ نانوجرام ng) ورخيص التكاليف . والقيم المأخوذه من هذه الطرق لابد وأن تقارن مع تلك المأخوذة من طريقه الثيوكروم .

الأختبار اللونى للثيامين (Stroev and Makarova , 1989)

عندما يتفاعل الثيامين مع diazophenylsulphonic acid فى الوسط القلوى يتكون معقد ذو لون برتقالى - أحمر .

الجواهر الكشافة : -

١ - مسحوق ثيامين Thiamine powder .

٢ - محلول sulphanilic acid (١ ٪ فى الماء) .

٣ - محلول نيتريت صوديوم sodium nitrite حديث التحضير (٥ ٪ فى الماء) .

٤ - محلول كربونات صوديوم sodium carbonate (١٠ ٪) .

التكنيك : -

١ - فى أنبوبة أختبار نظيفة جافة ، يضاف ٥ نقط من محلول حمض سلفانيليك sulphanilic acid و ٥ نقط من محلول نيتريت الصوديوم ، ثم يضاف إلى المخلوط قليل من مسحوق الثيامين على طرف ملعقة معملية spatula - tip ،

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وأخيراً يضاف ٥ نقط من محلول كربونات الصوديوم إلى محلول جوهر الداى آزو diaso المتكون فى الأنبوبة مع الثيامين .

٢ - تخلط محتويات الأنبوبة جيد ، فيلاحظ تكون لون برتقالى - أحمر .

تقدير الثيامين فى العينات الغذائية بطريقة الثيوكروم

(Schanderl , 1970 ; A.O.A.C , 1975)

الجواهر الكشافة :

١ - محلول هيدروكسيد صوديوم (١٥٪) : - يذاب ١٥ جم NaOH فى ماء ، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل .

٢ - محلول بوتاسيوم فرى سيانيد Pot. ferricyanide (١ ٪) : - يذاب ١ جم $K_3Fe(CN)_6$ فى مـاء ثم يكمل إلى ١٠٠ مل ، و يحضر هذا المحلول يوم الاستعمال .

٣ - جوهر التأكسد oxidizing reagent : - يؤخذ ٤,٠ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد فى دورق معيارى ١٠٠ مل ويكمل إلى العلامه بمحلول هيدروكسيد الصوديوم ثم يخلطا معاً جيداً ، و يستعمل هذا المحلول خلال ٤ ساعات من ساعة تحضيره .

٤ - Isobutanol : - مقطر فى جهاز تقطير زجاجى مرتين، ويستعمل إما لامائى anhydrous أو المشبع منه بالماء .

٥ - محلول Qunine sulphate stock : - يستخدم هذا المحلول لكى reproducibility of fluorometer ، ويحضر بأذابة ١٠ ملجم من كبريتات الكوينين فى محلول حمض كبريتيك (٠,١ N) ويكمل الحجم إلى لتر بنفس محلول الحمض، ويحفظ هذا المحلول فى زجاجات معتمة لاتنفذ الضوء .

٦ - محلول كبريتات الكوينين القياسى : يخفف حجم واحد من المحلول الـStock (جوهر رقم ٥) بـ ٣٩ حجم من محلول حمض الكبريتيك (٠,١ N) ، ويجب أن يكون وميض (فلورة) هذا المحلول تقارب نفس درجة فلورة الثيوكروم المستخلص

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بكحول الأيزوبيوتيل والمتحصل عليها من ١ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد . ويخزن هذا المحلول فى زجاجات معتمة غير منفذة للضوء

٧ – محلول Thiamine- HCl stock I : – يوزن بالضبط حوالى ٠,٠٥٠ – ٠,٠٦٠ ملجم من USP thiamine- HCl referece الذى سبق تجفيفه تحت P_2O_5 فى مجفف حتى يعطى وزن ثابت (وهذا لأن الثيامين مادة شرهة للماء hygroscopic ، ويحفظ الثيامين تحت هذه الظروف لتلافى أمتصاص الرطوبة) ثم تذاب الوزنة فى محلول كحول ايثايل ٢٠٪ ودرجه الـ p^H له مضبوطه على ٣,٥ – ٤,٣ بحمض HCl ثم يخفف إلى الحجم اللازم بنفس محلول الكحول المحمض حتى يعطى تركيز ١٠٠ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد لكل مل . ويحفظ هذا المحلول فى زجاجات محكمة الغلق وغير منفذة للضوء على ١٠° م .

٨ – محلول Thiamine - HCl stock II : – يخفف ١٠٠ مل من المحلول رقم (٧)إلى لتر بنفس المحلول الكحولى (٢٠ ٪ ، p^H ٣,٥ – ٤,٣) ، و تركيز هذا المحلول ١٠ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريدلكل مل (10 µg/ml) ، ويحفظ أيضاً فى زجاجات محكمة الغلق وغير منفذة للضوء .

٩ – محلول الثيامين هيدروكلوريد القياسى : – يؤخذ ١٠ مل من محلول رقم ٨ ويضاف إليها ٥٠ مل من محلول حمض HCl تركيزه حوالى ٠,١ N ثم يهضم digest أو يعقم فى الأتوكلاف autoclave كما يحدث فى أستخلاص العينة تماماً. وبعد أن يبرد المحلول يكمل إلى ١٠٠ مل بنفس محلول الحمض ، وتركيز الواحد مل من هذا المحلول يساوى ١ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد (1µg / ml) . ويحضر هذا المحلول طازجاً كل وقت تحليل . وفى حاله العينات الفقيرة فى محتواها من الثيامين يخفف ٢٠ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠ مل بنفس محلول الحمض ، وتركيز هذا المحلول المخفف هو ٠,٢ ميكروجرام ثيامين هيدروكلوريد لكل مل (0.2 µg / ml)

التكنيك : –

أ – الاستخلاص Extraction : –

١ – تؤخذ وزنة معلومة بالضبط من العينة وتوضع فى دورق نو حجم مناسب ، ثم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يضاف إليها حجم من حمض هيدروكلوريك (٠,١ N) بالمل وهذا الحجم مقداره ١٠ مرات من وزن العينة بالجرامات ولايقل عن ذلك . فى حاله عدم ذوبان العينة بسهوله ، يتم سحقها تفتيتها جيداً فى محلول الحمض ، وإذا حدث تجمعات للعينة ، فيجب رج العينة جيداً حتى تصبح جميع حبيبات العينة فى المحلول ، ثم تغسل جوانب الدورق بنفس المحلول .

٢ - يهضم المحلول لمدة ٣٠ ق على ٩٥ - ١٠٠° م فى حمام بخار أو حمام مائى مع التقليب بأستمرار أو بالتعقيم فى أوتوكلاف لمده ٣٠ ق على ١٢١ - ١٢٣° م ، ثم يبرد المحلول. وفى حالة ما تكون هناك تجمعات ، فيتم رج المحلول حتى تتشتت الحبيبات فى المحلول .

٣ - يخفف المحلول المهضوم بواسطة حمض HCl (٠,١ N) إلى حجم معلوم بالضبط بحيث يعطى حوالى ٠,٢ - ٠,٥ ميكروجرام ثيامين لكل مل ، ثم يرشح.

ب - أكسدة الثيامين إلى ثيوكروم : -

١ - يجهز عدد من الأنابيب (٤ على الأقل) بحيث تسع كل منها ٤٠ مل (يمكن أستعمال أوعية تفاعل خاصة reaction vessels) ويضاف لكل منها حوالى ١,٥ جم NaCl أو KCl .

٢ - إلى الأنبوبة الأولى (St.) يضاف ٥ مل من المحلول القياسى (الجوهر رقم ٩) ، ويجب الأخذ فى الأعتبار إن دقة وصحة النتائج تعتمد على تماثل وتجانس المحلول ولذلك لابد من أتباع التعليمات التالية بالضبط وهى تلافى تعرض المحلول للضوء الذى يتلف الثيوكروم ، وتستعمل ماصة تدفع ٣ مل من جوهر الأكسدة فى زمن قدرة ١ - ٢ ثانية . ويوضع طرف الماصة التى تحتوى على ٣ مل من جوهر الأكسدة فى رقبة الأنبوبة ويقبض عليها بحيث لا يسيل المحلول أو يلامس جدار الأنبوبة الداخلى ، كما تلف الأنبوبة فى حركة دائرية بسيطة بأستمرار . وفى الحال وبسرعة يضاف جوهر الأكسدة (٣,٠ مل) .

٣ - بعد أضافة الجوهر ، تخرج الماصة وتستمر الحركة الدائرية للأنبوبة لتمام التأكد من خلط المحلولين جيداً .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

٤ – بعد ذلك ، بسرعة وفي الحال يضاف ١٣ مل كحول أيزوبيوتايل وتغلق الأنابيب ثم ترج بشدة (على الأقل لمدة ١٥ ثانية) .

٥ – تعامل الأنبوبة الثانية (St . blank) بنفس الطريقة وبنفس الخطوات ، فيما عدا يستبدل جوهر الأكسدة بمحلول NaOH ١٠ ٪

٦ – إلى الأنبوبة الثالثة (assay) يضاف ٥ مل من محلول العينة المراد تقدير الثيامين فيها ، ثم تعامل بنفس طريقة الأنبوبة الأولى (.St) .

٧ – إلى الأنبوبة الرابعة (assay blank) يضاف ٥ مل من محلول العينة وتعامل بنفس الطريقة التي عوملت بها أنبوبة St. blank .

٨ – بعد اضافة كحول أيزوبيوتايل لكل أنبوبة ، وترج مره أخرى لمدة حوالي دقيقتين (لابد أن توضع الأنابيب في shaker box لهذا الرج الاضافي) .

٩ – الطرد المركزي على سرعات منخفضة حتى نحصل على محلول رائق . يؤخذ بالماصة أو بعملية decantation حوالي ١٠ مل من المستخلص الكحولي (الطبقة العليا) من كل أنبوبة وتنقل إلى cuvette لقياس فلورة الثيوكروم .

حـ – قياس فلورة الثيوكروم : –

١ – تقاس شده كثافة فلورة كل مستخلص كحولي بجهاز فلوره مناسب ، وطول موجة الاثارة nm٣٦٥ ، أما طول موجة الإنبعاث (أوالخارج out put) هو ٤٣٥ nm . ويستخدم محلول كبريتات الكوينين القياسي حتى يمكن التحكم في reproducibility of fluorometer .

٢ – يقاس وميض المستخلص الكحولي المتحصل عليه من أكسدة العينة (assoy) ، ولتكن القراءة هي A .

٣ – يقاس وميض المستخلص الكحولي المتحصل عليه من محلول العينة والذى تم معاملته بواسطة ٣ مل محلول NaOH ١٥٪ (assoy blank) ، ولتكن القراءة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

هى b .

٤ - وبالمثل تقاس فلورة المستخلص الكحولى المتحصل عليه من محلول الثيامين القياسى (.St) ، ولتكن القراءة هى S .

٥ - تقاس أيضاً الفلورة الخاصة بـ St . blank ، ولتكن القراءه هى d .

د - الحساب : -

يحسب عدد ميكروجرامات الثيامين هيدروكلوريد فى ٥ مل من محلول مستخلص العينة من المعادلة التالية : -

$$\mu g \text{ thiamine - HCL in 5 ml assoy solution} = \frac{(A - b)}{(S - d)}$$

هـ - التطبيقات العملية : -

تطبق هذه الطريقة على عينات غذائية جافة ومطحونة مثل دقيق القمح أو الذرة أو الشعير .... إلخ ، وعلى المكرونة وغيرها من الأغذية ، مع مراعاة أن تكون العينة مطحونة جيداً حتى يكون الأستخلاص على الوجة الأكمل . ويمكن تطبيقها على العينات الأخرى أيضاً مع مرعاة إجراء التعديلات المناسبة .

تقدير الثيامين بالطريقة اللونية (Schanderl , 1970)

تعتمد هذه الطريقة على تفاعل الثيامين مع Reinecke salt وتكوين راسب يمكن إذابتة فى أسيتون ، ثم يقاس لونياً على طول موجة مقدارها ٥٢٥ nm . ومحلول Reinecke salt (جوهر الكشاف) هو عبارة عن : -

Ammonium tetrathiocyanodiaminochromate $NH_4 [Cr (NH_3)_2] (SCN)_4 . H_2O$

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول Reinecke salt .

٢ - محلول ثيامين هيدروكلوريد المرجع (٠,١ ٪ ثيامين هيدروكلوريد مذاب

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فـــى حمض HCl (١٪) .

٣ – محلول خلات منظم (p^H = ٤,٥ ، ٠,١ N).

٤ – أسيتون .

التكنيك : –

١ – يؤخـذ ١٠ مل من مـــحلول العـــينة التى تحــتــوى على ٢ – ٥ ملجم ثيـــامين هيدروركلوريد فى مـحلول الخـلات المنظم (ويمكن الاستـعانة بالطريقـة السابقـة لتجهيز العينة (AOAC , 1975) . ، ثـم يضــاف إليهــا جـوهر Reinecke salt (الكمية تعتمد على تركيزه ، ولذلك تجرى أختبارات بسيطة قبل التقدير لتحديد حجمها) ، ثم يسمح للتفاعل بأن يتم وتكوين الراسب .

٢ – يجمع الراسب باستعمال بوتقة زجاج sintered glass crucible ويغسل جيداً .

٣ – يذاب الراسب فى ١٠ مل أسيتون ، ثم يكمل إلى حجم معلوم ويقاس اللون على طول موجة ٥٢٥ nm ضد البلانك .

٤ – يتم عمل منحنى قياسى ، بتطبيق نفس التكنيك على حجوم مختلفة من الثيامين القياسى المذاب فى محلول الخلا ت المنظم . وبتطبيق قراءة العينة على المنحنى القياسى يمكن حساب تركيز الثيامين هيدروكلوريد فى العينة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تقدير تركيز الثيامين فى مستحضرات البولى فيتامين

(Stroev and Makarova , 1989)

يقدر الثيامين فى هذه المستحضرات polyvitamin preparations عن طريق أكسدته إلى الثيوكروم بواسطة بوتاسيوم فرى سيانيد فى الوسط القلوى ، ثم يستخلص الثيوكروم بالبيوتانول ، وتقدر فلورته. وفى وجود محلول ثيامين قياسى ، يمكن حساب تركيز الثيامين فى هذه المستحضرات .

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول حمض هيدروكلوريك (M٠,١) .

٢ - بيوتانول عادى n - butanol .

٣ - مخلوط الأكسدة oxidising mixture : - يضاف ٨ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد (١ ٪) إلى ٢٠ مل من محلول NaOH (٣٠٪) ، وتخلط المحتويات جيداً . يستخدم هذا المحلول حديث التحضير ، ويحضر وقت الأستعمال .

٤ - محلول ثيامين قياسى (١٠ µg / مل) .

٥ - إيثانول .

التكنيك : -

١ - تطحن عينه البولى فيتامين جيداً بالهون (وزنة معلومة بالضبط) ، ثم يضاف إليها ٣٠ مل من محلول حمض الهيدروكلوريك على دفعات مع استمرار الطحن والتقليب .

٢ - إلى أنبوبة الكونترول (الأولى) يضاف ٥ مل من محلول الهيدروكلوريك ، وفى الثانية (العينة) يضاف مل واحد من مستخلص البولى فيتامين و ٤ مل ماء مقطر، وفى الثالثة (St.) يضاف ٥ مل محلول ثيامين قياسى .

٣ - يضاف لكل أنبوبة ١,٥ مل من مخلوط الأكسدة ، ثم تخلط جيداً لتمام تجانس المحاليل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤ – يضاف ٥ مل بيوتانول ، ثم تغلق الأنابيب جيداً وترج بشده لمده ٥ دقائق .

٥ – تترك الأنابيب حتى تنفصل محتوياتها إلى طبقتين ، ثم يضاف ٠,٥ مل ايثانول بحذر شديد وذلك لكى تروق طبقة البيوتانول .

٦ – تنقل طبقة البيوتانول عن طريقة decantation ، بحذر شديد إلى خلية قياس الفلورة ، ثم تقاس كثافة الفلورة fluorecence للثلاث أنابيب (العينه والكونترول والـ St .) بواسطة جهاز fluorometer .

الحساب : –

يحسب تركيز الثيامين من المعادلة التالية : –

$$X = \frac{(E_{sample} - E_{control}) \times 0.01 \times 1 \times 5.5}{E_{st.} \times 30}$$

علما بأن

X = هى كمية الثيامين فى البولى فيتامين بالملجم .

E_{sample} = هى كثافة فلورة محلول العينة (وحدات عرفية arbitrary units)

$E_{control}$ = هى كثافة فلورة محلول الكونترول بنفس الوحدات .

E_{st} = هى كثافة فلورة المحلول القياسى بنفس الوحدات .

0.01 = هو تركيز محلول الثيامين القياسى بالملجم / مل .

30 = هى حجم محلول استخلاص البولى فيتامين بالمل .

1 = هو حجم المستخلص المأخوذ للتحليل بالمل .

5.5 = هو حجم المحلول الرائق بواسطة الايثانول بالمل.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التطبيقات العملية Practical applications : -

يمكن استخدام هذه الطريقة لتقدير الثيامين في الأغذية والنباتات الطبية والأدوية الخام، كما تستخدم لتقديره في البول والدم وغيرها ، مع مرعاة اجراء التعديلات المناسبة .

تقدير البيروفات في الدم (Gloster and Harris , 1962)

هناك علاقة قوية تربط بين تركيز البيروفات pyruvate في الدم ونقص الثيامين . ففي حالة نقص الثيامين thiamine deficiency ، يقل نشاط الـ thiamine (TPP) pyrophosphate ولهذا السبب يعاق هدم catabolism البيروفات ، وعلى ذلك فإن تركيزها في الدم يزداد . وتقاس الآن البيروفات بطريقة أنزيمية باستعمال أنزيم (LDH) Lactate dehydrogenase ، ويسير التفاعل كما يلي :

$$CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-COO^- + NADH.H^+ \rightleftharpoons CH_3-\underset{\underset{H}{|}}{\overset{\overset{OH}{|}}{C}}-COO^-$$

Pyruvate Lactate

تحول البيروفات بفعل أنزيم LDH وفي وجود $NADH.H^+$ إلى لاكتات ، ويتم هذا التفاعل على درجة pH ٦,٩ . ويمكن تتبع التفاعل بقياس التغير في الامتصاص على طول موجة ٣٤٠ nm والذي يعزى إلى $NADH.H^+$. والطريقة التالية تم تعديلها بواسطة Boehringer

الجواهر الكشافة : -

١ – محلول TCA في HCl : – يذاب ١٠٠ جم ثلاثي كلورو حمض الخليك TCA في لتر من محلول حمض HCl تركيزه ٥٠٠ mM .

٢ – محلول فوسفات منظم (١,١ مول / لتر) :– يذاب ١٩,١٤ جم K_2HPO_4 في ١٠٠ مل ماء سبق تقطيره بجهاز تقطير زجاجي (GDW) .

٣ – محلول $NADH.H^+$ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) : -

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يذاب ٥ ملجم $NADH.H^+$ فى ١,٠ مل ماء مقطر (GDW) . وهذه أحسن طريقة لتحضيره حيث أنه من المفضل استخدامه طازجاً ، ولكن يمكن حفظه لأيام قليله على ٤ ° م .

٤ – محلول أنزيم LDH : – ٠,٧٥ ملجم بروتين أنزيمى لكل مل واحد من محلول كبريتات أمونيوم . وهذا المحلول متوافر تجارياً .

٥ – البيروفات القياسية (٢٥٠ ميكرومول μ mol / لتر) :– يذاب ٢,٣٥ ملجم بيروفات ليثيوم lithium pyruvate فى ١٠٠ مل ماء مقطر (GDW) .

التكنيك : –

١ – يؤخذ حوالى ٥ مل من الدم بواسطة حقنة syringe مناسبة مع مرعاة تلافى عملية ركود الدم الوريدى venous stasis ونشاط عضلات الساعد forearm muscles، فهذا أمر ضرورى جداً لأخذ العينة بنجاح . وبعد أخذ العينة بسرعة ، يحقن الدم المأخوذ فى أنبوبة طرد مركزى تحتوى على ٥ مل محلول TCA سبق وزنها . ترج الأنبوبة جيداً لتمام خلط محتوياتها ثم يعاد وزنها من جديد حتى نحصل على وزن الدم المضاف . ويمكن ايجاد حجم الدم المضاف بالقسمة على ١,٠٦٠ (الثقل النوعى specific gravity للدم) . ومن ناحية أخرى يمكن قياس حجم الدم بواسطة حقنة مدرجة .

٢ – يتم الطرد المركزى على ٢٠٠٠ r.p.m لمدة ١٠ ق ، و يؤخذ ٢,٠ مل من المحلول الرائق supernatant فى أنبوبة و ٢,٠ مل ماء فى أنبوبة أخرى (بلانك) ويضاف لكل منهما ٠,٧ مل محلول فوسفات منظم ، ثم ينقل ٢,٠ مل من كل منهما إلى خلايا قياس كوارتز quartz cuvettes مسار الضوء فيها ١٠ mm ، ويضاف إليها ١,٠ مل محلول فوسفات منظم اضافى ثم ٥٠ μl من محلول $NADH.H^+$.

٣ – تخلط المحتويات جيداً بالتقليب stirring ، وبعد دقيقتين يقاس الامتصاص على طول موجة ٣٤٠ nm ضد البلانك . يعاد القياس مرة أخرى بعد دقيقة للتأكد من حالة ثبات الوضع على هذه القراءة . ولابد أن تكون القراءة بين ٠,٥٠٠

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

و٠٠٨,٠ ، ثم بعد ذلك يضاف ٥٠ µl من محلول الأنزيم و تخلط جيداً بقطيب زجاجي ويقاس الامتصاص بعد دقيقتين وبعد كل دقيقة لمدة ٣ ق أخرى حتى لاتحدث إى تغيرات فى القراءة .

٤ - بالنسبة للدم الطبيعي المأخوذ من أشخاص فى وضع الراحة ، عادة ما نحصل على أختلافات فى الامتصاص (Δ A) بين ٠,٠٥٠ و ٠,١٠٠ .

هذا ، ويتم ضبط الطريقة واختبارها على فترات متباعدة وذلك بتطبيق الطريقة على البيروفات القياسية .

الحساب : -

لو كان حجم الدم المأخوذ هو V مل وكان $\frac{2V}{5+V}$ مل من الدم هو الموجود فى ٢,٠ مل من المحلول الرائق وأضيفت ٠,٧ مل من محلول الفوسفات المنظم إليها ، فيكون الحجم النهائى هو ٣,١ مل . وعلى طول موجة ٣٤٠ nm فى cuvette مسار الضوء فيها ١سم ، يكون التغير فى الامتصاص Δ A يعادل ١٦,١ميللى مول mmol بيروفات لكل مل من مخلوط التفاعل . وعلى يمكن تطبيق هذه المعادلة : -

$$\text{Blood pyruvate } (\mu\text{mol} / 1) = \frac{5+V}{2V} \times \frac{2.7}{2.0} \times \frac{\Delta A}{0.100} \times 3.1 \times 16.1$$

$$= 337 \times \frac{(5+V)}{V} \times \Delta A$$

التفسير : -

المستوى الطبيعي لبيروفات الدم المقدر بهذه الطريقة هو ٣٤ - ٨٠ µmol / لتر ، وفى حالات نقص الثيامين الملحوظة فيبلغ مستوى البيروفات ٢٢٠ إلى ٣٠٠ µmol / لتر ، ولوحظ أرتفاع مستوى البيروفات أيضاً فى مرض السكر diabetes mellitus وفى حالات الاسهال diarrhea وحالات إضطراب الهضم الأخرى وفى حالات تلف الكبد الحاد وفى بعض حالات العدوى الحادة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تقدير الثيامين فى البول بتفاعل الثيوكروم (Varley et al ., 1976)

الأساس النظرى للتقدير : -

يقدر الثيامين فى البول بعد تنقيته ، بأكسدته إلى ثيوكروم بمحلول فرى سيانيد قلوى ، و يستخلص المشتق الناتج من الأكسدة (الثيوكروم) بكحول بيوتايل أو ايزوبيوتانول ثم تقاس الفلورة بعد ذلك .

الجواهر الكشافة :-

١ - Decalso أو Permutit نشطة : - لكى تدمص أكبر كمية من الثيامين على هذا العامل المدمص ، لابد أن تتم عملية الأدمصاص بسرعة و لاتزيد عن دقيقتين . فيتم أولاً عمل معلق من عامل الادمصاص (٢٠٠ ملجم) مع حمض خليك ١ . ٠٪ فى مخبار كبير ، ثم تفصل الحبيبات التى لم ترسب خلال دقيقتين على الأكثر بعملية decantation . تغلى هذه الحبيبات ٣ مرات مع حمض خليك مخفف مع تغيير الحمض فى كل مرة بعملية decantation أيضاً ، ثم تغسل أخيراً بالماء المقطر وتجفف على ١١٠° م . إذا أضيف محلول بوتاسيوم فرى سيانيد إلى الراشح الناتج من الغسيل وأعطى لون أزرق بروسيا ، فيتم غسيل الرواسب مرة أخرى بمحلول حمض HCl متوسط التركيز ودافىء . ولابد من اختبار كفاءة عامل الادمصاص أولاً على ثيامين قياسى . و يظل نشاط هذا العامل المدمص ثابتاً لعدة شهور إذا حفظ جافاً .

٢ - محلول كلوريد بوتاسيوم (حوالى ٢٥٠ جم / لتر) .

٣ - محلول أيدروكسيد صوديوم (١٥٠ جم / لتر) .

٤ - محلول بوتاسيوم فرى سيانيد (٢,٥ جم / لتر) حديث التحضير .

٥ - كحول أيزوبيوتايل أو بيوتايل عادى .

٦ - حمض خليك ثلجى حوالى (١٠ مل / لتر ماء).

٧ - محلول stock standard thiamine-hydrochloride (٤٠ ملجم / لتر) : -

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يذاب ٤,٤٨ ملجم ثيامين - هيدروكلوريد فى ١٠٠ مل ماء .

٨ - محلول working standard (٤٠٠ μg / لتر) : - يخفف ١,٠ مل من محلول (٧) stock standard إلى ١٠٠ مل بالماء ويضاف إليه ٤٠٠ ملجم حمض أكساليك .

الطريقة : -

١ - تجمع عينه البول ليوم كامل (٢٤ ساعة) فى أوعية زجاجية وتحفظ فى زجاجات معقمة ويضاف إليها ١٠٠ ملجم حمض أكساليك لكل ٢٥ مل بول .

٢ - يؤخذ ٢ مل بول (يؤخذ ٠,٥ مل لو كان تركيز الثيامين عالى) ، و٢ مل محلول ثيامين قياسى ، و ٢ مل ماء (بلانك) فى ثلاث أنابيب زجاجية ذات غطاء .

٣ - لكل واحدة منهم يضاف ٢٠ ملجم عامل إدمصاص نشط ثم تخلط بالرج بشدة (١٠ مرات) . وتصل أقصى كفاءة للادمصاص على درجة p^H = ٣ - ٦ ، ويتم التأكد من ذلك (ضبط p^H) باستخدام حمض أكساليك .

٤ - يضاف ٨ مل حمض خليك ، وتخلط جيداً عن طريق قلب الأنبوبة (١٠ مرات) ، ثم تترك فترة بسيطة ويتم التخلص من المحلول الرائق . تعاد هذه العملية (غسيل) عدة مرات حتى يمكن التخلص من المواد المتداخلة وأخيراً يتم الحصول على عامل الادمصاص وقد أدمص عليه الفيتامين .

٥ - يضاف ٠,٥ مل من محلول كلوريد البوتاسيوم ثم يرج برفق مع مراعاة تجانس عامل الادمصاص مع المحلول المحل بالكامل .تتم عملية الاحلال هذه فى خلال ٣٠ ثانية .

٦ - يضاف ٠,١ مل من محلول بوتاسيوم فرى سيانيد ، و ٠,٢٥ مل من محلول أيدروكسيد الصوديوم مع الرج بعد كل إضافة .

٧ - يضاف ٢ مل كحول أيزوبيوتانول وتقفل الأنبوبة وترج بشدة لمدة حوالى دقيقة (حوالى ٢٥ مرة وترج لأعلى وأسفل) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٨ - تترك حتى تنفصل إلى طبقتين أو تطرد مركزياً لفترة وجيزة .

٩ - ينقل الجزء الرائق إلى أنبوبة قياس ، ثم تقاس الفلورة فى جهاز fluorometer على طول موجة ٤٣٥ nm باستعمال طول موجة ٣٦٥nm للإثارة excitation ، مع ضبط الجهاز على الصفر باستعمال البلانك .

الحساب : -

يحسب تركيز الثيامين فى البول من هذه المعادلة : -

$$\text{Urinary thiamine chloide } (\mu g / 1) = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times \frac{800}{V}$$

حيث أن : -

V هى حجم البول بالمل المأخوذ للتحليل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فيتامين ب٢ (الريبوفلافين) - Vit. B_2 (Riboflavin)

H_2C—CH(OH)—CH(OH)—CH(OH)—CH_2OH

H_3C ، H_3C ، N ، N ، NH ، O ، O

تفاعلاته :

هذا الفيتامين ثابت للحرارة ، ولكنه يسود blacken عند ٢٤٠ °م ، وغير ثابت فى الوسط القلوى حيث يتحول إلى lumiflavin ، ويتلف بالأكسدة . أما بالأختزال فيتحول بسهولة إلى leucoriboflavin ، ويتحلل ضوئياً photolysis إلى lumiflavin ويعطى فلورة زرقاء كثيفة على طول موجة ٥٦٥ nm . وهو ثابت فى الوسط الحامضى ويذوب فى الماء الحامضى .

الذوبان :

يذوب فى الماء (٠,٠١ جم / ١٠٠ مل ماء) ، وغير ذائب فى الكحول والأسيتون والبنزين والكلوروفورم .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

صورته النقية :

يكون فى صورة مسحوق أصفر - برتقالى ، والصورة البللورية له أبرية needles . ويوجد فى صورة ملح بورات أو فوسفات أو خلات .

خواصه :

أقصى أمتصاص له عند الأطوال الموجية ٢٢٠ و ٢٦٧ و ٣٣٦ و ٤٤٦ nm ، وهو ذات طبيعة كيميائية مختزلة (عامل مختزل) ، وهو عباره عن نيكلوتيد بيورين مستبدل .

انتشاره ومصادره :

١ - **وجوده فى النباتات** : يوجد فى كل الفواكه والخضروات بكمية قليله ، ماعدا فى ورق الطماطم فيوجد بكمية كبيرة . وفى الخضروات الورقية والذرة والبقول والقرنبيط فيوجد بكمية متوسطة . وفى النقل يوجد بكمية متوسطة . وفى زهور الزعفران saffran يوجد بكمية كبيرة .

٢ - **وجوده في الحيوانات** :- يختلف تركيزه على حسب نشاط العضو ، فهو فى الكبد > الكلى > القلب > الأنسجة الأخرى .

٣ - **وجوده فى الكائنات الحية الدقيقة** :- يوجد فى كل الكائنات الحية الدقيقة خصوصاً الخميرة والبكتريا اللاهوائية ، فيوجد فيها بتركيزات عالية.

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** :- من ١٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠ ميكروجرام لكل ١٠٠ جم ، كما فى الأغنام والعجول والبقر والخنزير (كبد وكلى) ، وفى الدجاج (كبد)، والخميرة (الغير حية) .

٢ - **المصادر المتوسطة** :- من ١٠٠ إلى ١٠٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم ، كما فى الأفوكادو avocados (فاكهه) والأسبراجس والبقول بأنواعها والقرنبيط والذرة والبسلة وفول الصويا (الجاف) والسبانخ والفول السودانى وجنين القمح ونخالة الأرز والشوفان والجبن والبيض واللبن . وفى لحم البقر والدجاج والبط والأوز الخنزير والرومى والسمك والأغنام .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣ - **المصادر القليلة** :- من ١٠ - ١٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم ، كما فى التفاح والموز والمشمش apricots والفراولة والكريز والعنب والجريب فروت والبرقوق والكرنب والجزر والباذنجان egg plant والخس والأبصال والفلفل والبطاطس والفجل والبطاطا والطماطم والشعير والأرز .

الدور الطبى والغذائى :

١ - **وحدات فيتامين ب٢** : - : وحداته وزنية ملجم أو ميكروجرام .

٢ - **المستويات الطبيعية فى الدم** : - ٦,٦ ميكروجرام / ١٠٠ مل .

٣ - **المقررات الموصي بها** :

للأطفال يوصى بأعطاء ٠,٦ - ١,٢ ملجم / يوم .

وللبالغين يوصى باعطاء ١,٥ ملجم / يوم للأناث ، و ١,٧ ملجم / يوم للذكور .

٤ - **اعطاءه** : - عن طريق الحقن (I.V) وبالفم وهذا هو الطريق المفضل .

٥ - **أعراض النقص** : -

فى الإنسان : -

التهاب ألفم stomatitis و التهاب اللسان clossitis chellosis والتهاب جلدى مع فرط افراز الغدد الدهنية seborrheic dematitis . كما تظهر أعراض متعلقة بالعين والخوف من الضوء photophobia والرؤية غير الواضحة indistinct vision و زيادة الضغط الوعائى فى القرنية corneal vascuarity .

فى الفئران : -

نمو هزيل poor growth و أعراض عينية غير عادية و التهاب جلدى (أكزيما eczema) وثقوب فى الأنف nostrils والعيون eyes وانحلال النخاعين myelin degeneration ، و تلف الخصى testicular atrophy و انكماش الثيموس thymus involution .

فى الكلاب :

فقد الوزن و كبد دهنى fatty liver و هزال عضلى muscle weakness وعتامة أغشية

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

القرنية opacity of conreal epithelium .

فى الدجاج :-

أنخفاض انتاج البيض ، وانخفاض نسبه الفقس ، و انحلال عصبى nerve degeneration .

في القرود Monkey :-

أنيميا (فقردم) anemia ، و نقص عدد كرات الدم البيضاء leukopenia .

٦ - أمراض النقص :

التهاب اللسان والتهاب جلدى مع فرط افراز الغدد الدهنية وفقردم و زيادة الضغط الوعائى فى القرنية .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه :- جميع الكائنات تحتاج اليه .

أ - مصادر داخلية Endogenous :- تسطيع النباتات العالية والطحالب وبعض البكتريا وبعض الفطريات تخليقة .

ب - مصادر خارجية Exogenous :- كل الحيوانات وبعض البكتريا والفطريات تحتاجه من مصادر خارجية ، والبكتريا المعوية يمكنها تخليقة ولكن فى معظم الحالات يكون غيرمتاح unavailable للإنسان .

٨ - تأثير الجرعات العالية :

فى الإنسان ، أساساً فيتامين ب٢ غير سام nontoxic ، ولكنها تشوش الحس paresthesa وتسبب الحكة (هرش) itching . أما فى الفئران فتسبب إنحباس فى البول anuria و زيادة المواد النيتروجينية فى الدم نتيجة لخلل فى الكلية azotemia وقلة كفاءة الكلية kidey insufficiency. .

تحليل فيتامين ب٢

أ - فصل فيتامين ب٢ :

يمكن فصل الريبوفلافين من مصادره الطبيعية بتتابع العمليات التالية :

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

١ - الاستخلاص بمذيب مناسب .

٢ - الادمصاص على أعمدة كروماتوجرافية .

٣ - الاحلال elution بالمذيبات العضوية مثل (الأسيتون - ميثانول - ايثانول - بيوتانول) ، سواء على درجة حرارة الغرفة أو على درجة غليانها .وهى تستخدم لفك أو لتحرير liberate الفيتامين من الصور المرتبطة .

ويمكن وضع المستخلص فى عمود كروماتوجرافى يحتوى على مادة مدمصة مناسبة مثل florisil أو fuller's earth فى محلول حامض أوعلى frankanit فى محلول متعادل . وهناك محلول مُحل eluent ممتاز لذلك وهو pyridine مخفف بإيثانول أو ميثانول مائى . وهناك Eluents أخرى يمكن استخدامها وهى أسيتون ٨٠٪ ، إيثانول ٦٠ ٪ يغلى ، أمونيا ، triethanolamine .

وبالرغم أن الفحم المنشط charcoal يرتبط بقوة مع الريبوفلافين ، إلا أنه من الصعب أنحلاله elute من هذا العامل المدمص .

ويمكن بعد إنحلال الفيتامين وبللورته باستخدام مذيب الاستخلاص ثم الترسيب . ومن أحسن مذيبات البللورة (مخلوط مائى من اسيتون و Pet - ethanal) . والريبوفلافين المختزال غير ذائب بدرجة كبيرة وهذه ميزة حسنة لبللورة الفيتامين ، فعلى سبيل المثال فى مستحضرات الريبوفلافين التجارية المتحصل عليها من التخليق البكتيرى ، يضاف sodium dithionite إلى بيئة البكتريا broth بعد التخمر ، فيترسب الريبوفلافين المختزل نتيجة تجميعه . وتتم تنقيته ثم أكسدته رجعياً إلى الريبوفلافين .

ب - تقدير فيتامين ب$_{٢}$:

يقدر محتوى الريبوفلافين فى كل من الأنسجة والسوائل الحيوية biological fluids بكل من الطرق الفلورومترية والميكروبيولوجية . وبالرغم من أن الطرق الميكروبيولوجية أكثر حساسية ، إلا أنها تتطلب ١ - ٣ أيام حتى تكتمل . أما الطرق الفلورومترية فإنها تكتمل خلال عمل يوم واحد .

كل من المعاونين الأنزيمين FAD و FMN (صورة الريبوفلافين فى الأنسجة) يرتبطا مع البروتين ويجب فكهما وأحلالهما قبل التقدير أو التحليل . ويمكن إجراء هذا سواء

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بالمعامله بحامض أو بالانزيمات .

١ - الطرق الفلورومترية :

تعامل السوائل الحيوية أو محلول النسيج الحيوى المجنس تماماً homogenate بمحلول مخفف من TCA لفصل الفلافينات flavins عن البروتين . فتحضين المواد المحتوية على FAD مع الـ TCA يؤدى إلى تحليل مائى لـ FAD إلى FMN . والريبوفلافين و FMN لهما فلورة متساوية . أما الـ FAD فله فلورة فقط ١٤ ٪ من هذه القيمة .

فى بعض الطرق تعامل المستخلصات بمحلول $KMnO_4$ مخفف لأكسدة المركبات التى لها فلورة والتى قد تتداخل مع التقدير ، وفى طرق أخرى تمرر المستخلصات خلال عمود florisil ثم تحل elute بمحلول بيريدين - حمض خليك . وفى هذه الطريقة ، يعد جهاز قياس الفلورة fluorometer باستعمال fluorescen قياسى ، وتقراء العينات قبل وبعد اضافة محلول sodium hydrosulfite ($NaHSO_3$) ، والأنخفاضات الأخيرة quenches تمثل فلورة الريبوفلا فين . وتلك الطريقة تجعله ممكن تقديره (الريبوفلافين) مميزاً عن إى ماده أخرى فى العينة لها خاصية فلورة أيضاً .

و الريبوفلا فين يذوب فى كحول البنزيل benzyl alcohol بدرجة كبيرة جداً ، أما FMN و FAD فلا يذوبان ، لذلك فهذا المذيب ممتاز لتقدير الريبوفلافين الحر .

٢ - الطرق الميكروبيولوجية : -

أول طريقة ميكروبيولوجية لتقدير الفيتاميات كانت على الريبوفلافين . وتحضر العينات الناتجه من المعاملة بحمض HCl (٠,١ N) بالتعقيم فى الأتوكلاف autoclaving للتحرير الفلافينات . وكل من الريبوفلافين و FAD و FMN لهم نفس النشاط على الكائنات الحية الدقيقة على أساس جزيئى (فرق بينها وبين الطرق الفلورومترية) . ويمكن معامله العينة بأنزيم مثل clarase لتحرير الفلافيتات ، ثم يرشح خلال ورق خاص للتخلص من الأحماض الدهنية والتى تتداخل مع النمو البكتيرى .

ويعمل المنحنى القياسى باستخدام ريبوفلافين نقى برسم العلاقة بين التركيز و أنتاج الحامض أو نفاذية الضوء . وتستخدم بكتريا L. casei لهذا التقدير والتى تحتاج إلى ريبوفلافين للنمو ، وتقاس العكارة turbidity (والتى ترجع لنمو البكتريا) على جهاز قياس

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الألوان (أو قياس العكارة) بعد ١٦ - ٢٤ ساعة والنامية على ٢٧ ° م . ويمكن تقدير حمض اللاكتيك الناتج من نمو البكتريا بعد ٧٢ ساعة ، والناتج من تخمر الجلوكوز وذلك بالمعايرة بمحلول قلوى مخفف فى وجود دليل مناسب . ويقدر الريبوفلافين فى العينات باستخدام المنحنى القياسى أيضاً .

٣ - الطرق الحيوية : -

ويتبع فيها الأساس العام لهذه الطرق حيث تضاف المادة المراد تقدير الفيتامين فيها إلى عليقه خالية تماماً منه وتحتوى كل متطلبات الغذاء الأخرى . ويستخدم لهذا التقدير rats. وفى هذه الطرق يتم تغذية الفئران المفطومة weanting rats على علائق خالية من الفيتامين لمدة ٢ - ٣ أسابيع حتى يتوقف النمو . ثم تقسم الحيوانات إلى مجموعات متجانسة فى الوزن والجنس و تضاف المادة المختبرة إلى العليقة بمستويات مختلفة (مدة التقدير عاده ٤ أسابيع) . ويرسم منحنى قياسى لعلاقة معدل النمو للمجموعات الكونترول والجرعات المعطاة لها، ويقدر منه كمية الريبوفلافين فى العينة المختبرة . هذا وقد أمكن استخدام الدجاج فى التقدير أيضاً .

الطرق الحيوية تتطلب مادة ذات فاعلية عالية ، اما المواد ذات فاعلية منخفضة فإنها تضاف بكميات كبيرة ، بالرغم من أن ذلك يؤثر على محتوى العليقة من الدهن والبروتين والكربوهيدرات وخلافه . أحسن طرق التقدير الحيوية هى الطرق الميكروبيولوجية فهى الطريقة المختارة لأنها أقل تكلفة وأقل فى الوقت المستهلك ، كما إنها تعطى نتائج جيده عند مقارنتها بطرق animal bioassay .

اختبار تمييز الريبوفلافين ومعاونات الأنزيمات الفلافينية

(Stroev and Makarova , 1989)

يعتمد هذا الاختبار على أن الصور المؤكسدة للريبوفلافين ومعاونات الأنزيمات الفلافينية (FAD , FMN) عند تعرضها لضوء الأشعة فوق البنفسجية تعطى وميض ذو لون أصفر - أخضر .

الجواهر الكشافة :

١ - محلول ريبوفلافين (٠,٠٠٢ ٪) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ – محلول Riboflavin mononucleotide (FMN) (٠,٠٠٢ ٪) ، وهذا المركب متوفر فى صورة محلول فى أمبولات inpoules تركيزه ٠,١ ٪ .

٣ – محلول flavinate (٠,٠٠٢٪) ، وهو متوافر فى صورة محلول صيدلى فى أمبولات أيضاً (المركب الفعال فيها هو FAD) .

٤ – مسحوق Sodium hydrosulphite .

التكنيك : –

١ – فى أنبوبة اختبار نظيفة ، يؤخذ ١٠ نقط من محلول الريبوفلافين ، و فى أنبوبة أخرى يؤخذ ١٠ نقط من محلول FMN ، وفى ثالثة يؤخذ ١٠ نقط من محلول الفلافينات flavinate (FAD) ، ثم يضاف إلى كل منها ٥ مل ماء مقطر وتخلط جيداً .

٢ – توضع الأنابيب فى fluoroscope cuvette holder وتقارن كثافة الوميض بينها بالعين المجردة .

٣ – يضاف لكل أنبوبة قليل من مسحوق sodium hydrosulphite ، والذى يعمل كعامل مختزل reductant ، ثم يلاحظ اختفاء الفلورة .

تقدير تركيز الريبوفلافين فى مستحضرات البولى فيتامين

(Stroev and Makarova , 1989)

والأساس النظرى للتقدير هو نفس الأساس النظرى لاختبار تمييز الريبوفلافين السابق ذكره .

الجواهر الكشافة : –

١ – محلول حمض هيدروكلوريك (٠,١ M) .

٢ – حمض خليك ثلجى glacial acetic acid .

٣ – محلول برمنجنات بوتاسيوم $KMnO_4$ ٤ ٪ .

٤ – محلول فوق أكسيد هيدروجين H_2O_2 ٣ ٪ .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

٥ – محلول ريبوفلافين قياسى ٠,٠٠٥ ملجم / مل .

التكنيك : –

١ – تطحن وزنة معلومة بالضبط من عينه البولى فيتامين فى هون ويضاف إليها ٣٠ مل من محلول حمض الهيدروكلوريك على دفعات مع أستمرار الطحن التقليب .

٢ – يضاف ٧ مل ماء مقطر إلى أنبوبة الكونترول ، وفى أنبوبة ثانية (أنبوبة العينة) يضاف ٢ مل من مستخلص البولى فيتامين و ٥ مل ماء مقطر ، أما فى الأنبوبة الثالثة (.St) فيضاف ٠,١مل من محلول الريبوفلافين القياسى و٦ مل ماء مقطر .

٣ – إلى كل أنبوبة يضاف ١٠ نقط من حمض الخليك الثلجى و ١,٥ مل من محلول برمنجات البوتاسيوم (لأكسدة المواد المتداخله التى لها فلورة) .

٤ – ترج الأنابيب ثم يضاف إليها ٥ فقط (نقطة نقطة مع الخلط بحذر) من محلول فوق أكسيد الهيدروجين مع أستمرار التقليب بساق زجاجى حتى يصبح المحلول رائقاً تماماً .

٥ – تترك الأنابيب لمدة ٥ ق حتى ينعدم تصاعد الفقاقيع الدقيقة microbubbles .

٦ – تنقل المحاليل إلى خلية قياس الفلورة لتقدير قيمه فلورة كل منها .

الحساب : –

يحسب التركيز من المعادلة التالية : –

$$X = \frac{E_{sample} - E_{control} \times 2 \times 0.005 \times 7}{E_{st.} \times 30}$$

حيث أن :–

X = هى كمية الريبوفلافين فى العينة .

E_{sample} = هى كثافة فلورة محلول العينة (orbitrary uints) .

$E_{control}$ = هى كثافة فلورة محلول الكونترول .

$E_{st.}$ = هى كثافة فلورة المحلول القياسى .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

30 = هى حجم محلول أستخلاص البولى فيتامين بالمل .

2 = هى حجم محلول المستخلص المأخوذ للتحليل بالمل .

0.005 = هو تركيز محلول الريبوفلافين القياسى (ملجم / مل).

7 = هى حجم المحلول المأخوذ لقياس الفلورة بالمل .

التطبيقات العملية : -

يمكن تطبيق هذه الطريقة على المواد المختلفة (غذاء ومستحضرات طبية وبول ودم .....إلخ) ، مع مرعاة إجراء التعديلات المناسبة .

تقدير الريبوفلافين فى العينات الغذائية بطريقة الفلورة

(Schanderl , 1970)

الجواهر الكشافة : -

جميع المواد الكيماوية المستخدمة يجب أن تكون AR (reagent grade) .

١ - محاليل حمض HCl : - يستعمل ٣ تركيزات مختلفة منه : -٠,١ N و ٠,١ N و ٠,٠١ N .

٢ - محاليل هيدروكسيد صوديوم : - يستعمل ٣ تركيزات مختلفة أيضاً ٠,١ N و ١,٠ N و ٠,٠١ N .

٣ - محلول برمنجنات بوتاسيوم $KMnO_4$ (٣ ٪) حديث التحضير .

٤ - محلول فوق اكسيد الهيدروجين (٣ ٪) حديث التحضير: - ويحضر بتخفيف المحلول المركز (٣٠ ٪) بنسبة ١ : ١٠ بالماء

٥ - محلول Stock riboflavin standard (٢٥ µg / مل) .

٦ - محلول Riboflavin working standard (٠,٥ µg / مل) : - ويحضر فى الحال وقبل الاستعمال بتخفيف مل واحد من المحلول رقم (٥) إلى ٥ مل بالماء المقطر .

٧ - Stock solution of sodium fluorescein : - يذاب ٥٠ ملجم Sodium

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

fluorecein فى ماء ويكمل إلى ١٠٠ مل .

٨ - Dilute solution of sodium fluorescein : - يخفف مل واحد من الجوهر رقم (٧) إلى ١٠٠ مل بالماء (٥٠ µg / لتر) .

٩ - Sodium hydrosulfide (dithionite, $Na_2S_2O_4$)

التكنيك : -

أ - استخلاص العينة : -

توزن وزنة معلومة بالضبط من العينة بحيث تحتوى على حوالى ٥ - ١٠ ميكروجرام ريبوفلافين ، وتنقل كمياً إلى دورق سعة ١٢٥ مل ، ثم يضاف إليها ٥٠ مل من محلول حمض HCl ٠,١ N وتعقم فى الأتوكلاف لمدة ٣٠ ق على ضغط مقداره ١٥ رطل / بوصة ٢ .

ب - ترسيب المواد المتداخلة interfering impurities : -

١ - بعد التعقيم والتبريد ، تضبط درجة الـ p^H للمحلول على ٦,٠ باستخدام محلول NaOH ٠,١ N بحذر شديد ، ويضاف محلول NaOH بكميات صغيرة رويداً رويداًمع الرج باستمرار لتلافى تركيز القلوى فى مكان دون الآخر ، فهذا يؤدى إلى تلف الفيتامين .

٢ - يعاد ضبط درجة الـ p^H إلى ٤,٥ مرة أخرى ، وفى الحال بأستعمال حمض HCl ٠,١ N ، ثم يخفف إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ثم يرشح .

٣ - يؤخذ ٥٠ مل من الراشح ويضاف إليها حمض HCl ٠,١ N نقطة نقطه حتى لا تتكون رواسب أخرى مع مرعاة الرج والتقليب باستمرار وبحركة ثابتة ، ثم تضاف نقطة أخرى لتمام التأكد من ترسيب كل المواد المتداخلة .

٤ - تضاف تقريباً نفس عدد النقط من محلول NaOH ٠,١ N ، ثم يخفف المحلول إلى ١٠٠ مل بالماء ، ثم يرشح المحلول إذا لزم الأمر ، وتضاف كمية أخرى من حمض HCl ٠,١ N بعد إضافة محلول NaOH للتأكد من أن الـ p^H لم تزد عن ٦,٦ .

جـ - تحميض acidification **المستخلص : -**

١ - يؤخذ ١٠ مل من محلول العينة فى أنبوبة أختبار ويضاف إليها مل واحد ماء ثم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تخلط المحتويات جيداً .

٢ – يؤخذ ١٠ مل من محلول العينة أيضاً فى أنبوبة أخرى ويضاف إليها مل واحد من محلول الريبوفلافين القياسى ثم تخلط المحتويات جيداً .

٣ – يضاف لكل أنبوبة مل واحد حمض خليك ثلجى وتخلط المحتويات جيداً .

٤ –يتم عمل زوج double لكل تقدير .

د – الأكسدة : –

١ – يضاف ٥,٠ مل من محلول البرمنجنات ٣٪ إلى كل أنبوبة وتخلط جيداً وتترك دقيقتين بالضبط ، ثم بعد ذلك يضاف ٥,٠ مل من محلول فوق أكسيد الهيدروجين ٣ ٪ والخلط جيداً وبشدة .

٢ – لابد أن يزول اللون الأحمر خلال ١٠ ثوان ، ولو تكونت رواسب دقيقة من ثانى أكسيد المنجنيز $Mn\ O_2$ تفصل بالطرد المركزى .

هـ – قياس الفلورة Fluorometry : –

١ – يضبط الجهاز بمحلول رقم (٨) sodium fluorecein (٥٠ µg / لتر) حتى يعطى أنحراف deflection مقداره ٨٠ على تدريج الجلفانومتر glavanometer scale ، ويعاد ضبط الجهاز بين القراءات وبعضها ، ويختبر الجهاز أيضاً قبل القراءة بتركيزات مختلفة من محاليل الـ fluoresent القياسية .

٢ – تقاس فلورة الأنبوبة التى تحتوى على ١٠ مل مستخلص العينة و ١,٠ مل ماء ، ولتكن القراءة هى A .

٣ – يضاف إليها مع الخلط ٢٠ ملجم $Na_2S_2O_4$ ، ثم تقاس الفلورة مرة أخرى خلال ١٠ ثوان ، ولتكن القراءة هى C .

٤ – تقاس فلورة الأنبوبة التى تحتوى على الريبوفلافين المضاف ، ولتكن القراءة B .

و – الحساب : –

يحسب تركيز الريبوفلافين بالميكروجرام لكل جرام عينة من هذه المعادلة : –

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

$$\text{Riboflavin content in } \mu g / g \text{ sample} = \frac{A-C}{B-C} \times \frac{\text{Riboflavin increment}}{10 \text{ ml aliquot}} \times \text{dilution factor} \times \frac{1}{\text{sample wt.}}$$

حيث أن : -

Riboflavin increment = هو عبارة عن تركيز الريبوفلافين المضاف ، وهو يساوى ٠,٥ ميكروجرام .

dilition factor = هو معامل التخفيف المستخدم فى تخفيف العينة من خطوة الاستخلاص حتى التقدير

sample wt. = وزن العينة المستخدم فى التقدير .

10 ml aliquot = حجم مقداره ١٠ مل المستخدم فى القياس .

ز – التفسير :

إن تكنيك الزيادة increment technique المستخدم هنا (يضاف الريبوفلافين القياسى إلى ريبوفلافين العينة) ، يسمح بتقدير الريبوفلافين فى وجود مواد متداخلة مثل الأملاح والألوان الغريبة .

هذا ، ويمكن تطبيق هذه الطريقة على عينات غذائية عديدة مثل دقيق القمح ودقيق الذرة أو الشعير .... إلخ . وينصح بتطبيق هذه الطريقة على العينات التى تحتوى على مواد متداخلة قليلة التركيز حيث تعطى قراءات blank صغيرة .

تقدير الريبوفلافين بالطريقة الرسمية (A.O.A.C,1990)

الجواهر الكشافة : – جميع الجواهر المستخدمة يجب أن تكون AR .

١ – محاليل الريبوفلافين القياسية : –

ملحوظة : – لاترج هذه المحاليل المخزنة تحت طولوين toluene .

أ – المحلول الـ stock (١٠٠ ميكروجرام / مل) : – يذاب ٥٠ ملجم من الريبوفلافين القياسى USP ref. (سبق تجفيفه فى الظلام فى مجفف يحتوى على P_2O_2) فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

قليل من حمض الخليك (٠,٠٢ N) ثم يكمل إلى ٥٠٠ مل . ولتسهيل الذوبان تذاب الوزنة أولاً فى حوالى ٣٠٠ مل حمض خليك دافىء مع استمرار التقليب والتدفئة فى حمام بخار حتى تمام الذوبان ، ثم يبرد ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل بنفس الحمض . يخزن تحت طولوين على حوالى ١٠ ° م .

ب – المحلول الوسط intermediate (١٠ ميكروجرام / مل) :– تخفف ١٠٠ مل من المحلول الـ stock إلى لتر بنفس محلول حمض الخليك ، وتخزن أيضاً تحت طولوين على ١٠ ° م .

حـ – محلول الـ working solution I (ميكروجرام / مل) : – ويحضر بتخفيف ١٠ مل من المحلول الوسط إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ، ويحضر طازجاً عند كل تقدير.

د – محلول الـ working solution II (٠,١ ميكروجرام / مل) : – ويحضر بتخفيف ١٠ مل من المحلول الوسط إلى لتر بالماء المقطر ، ويحضر أيضاً طازجاً عند كل تقدير .

٢ – **مسحوق** sodium hydrosulfite : – عالى النقاوة ويخزن بعيداً عن الضوء والهواء ويختبر جزء منه كما يلى : إلى أنبوبتين أو أكثر يضاف ١٠ مل ماء مقطر ومل واحد من محلول الريبوفلافين القياسى يحتوى على ٢٠ ميكروجرام ويعامل كما فى خطوه القياس (كما سيلى ذكرها) ويضاف إليها ٨ ملجم $Na_2S_2O_4$ ، يجب أن تختزل كل كمية الريبوفلافين بالكامل خلال ٥ ثوان أو أقل بهذه الكمية من الـ $Na_2S_2C_4$.

٣ – **محلول الاستخلاص** :– يخلط ٣٠ مل ميثانول و ١٠ مل بيريدين و ١٠٠ مل ماء و ١٠ مل حمض خليك (ويمكن تحضير كمية أصغر من ذلك ، ولكن بنفس النسب) .

التكنيك : –

أ – تحضير محلول العينة : –

ملحوظة : – يجب تلافى تعرض المحاليل للضوء ، ودرجة الـ pH لاتزيد عن ٧ ، وخلال الترشيح المباشر على ورق ترشيح ، لابد من استعمال ورق ترشيح معروف أنه لايدمص الريبوفلافين (ورق الترشيح الخالى من الرماد مناسب لهذا) .

تؤخذ وزنة معلومة بالضبط من العينة وتوضع فى دورق ذو حجم مناسب وتطبق أحدى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الطرق التالية للاستخلاص كما يلى : -

١ - بالنسبة للمواد الجافة dry والنصف جافة semidry التى بها كميات صغيرة أو كميات لا يمكن أدراكها من المواد الأساسية basic substances : - يضاف حجم من حمض HCl (٠,١ N) يعادل ١٠ مرات أو أكثر (بالمل) وزن العينة بالجرامات . والمحلول الناتج لابد أن يحتوى على أقل من ٠,١ ملجم ريبوفلافين / مل . لو كانت العينة غير قابلة للذوبان ، يستمر فى محاوله ذوبانها مع استعمال الرج بقوة ثم يغسل السطح الداخلى للدورق بنفس محلول الحمض . يسخن المخلوط فى أتوكلاف على ١٢١ - ١٢٣ ° م (١,١ - ١,٢ كيلو جرام / سم٢) لمدة ٣٠ ق ثم تبرد . وإذا حدث تجمعات للعينة فلابد من الرج حتى تتفتت حبيبات العينة . تضبط درجة الـ p^H للمحلول على ٦,٠ - ٦,٥ بواسطة محلول NaOH مع الرج باستمرار . ثم فى الحال يضاف حمض HCl مخفف حتى لاتظهر إى رواسب مع إى اضافة جديدة (عادة الـ p^H حوالى ٤,٥ ، وهى نقطة التعادل الكهربى لبروتينات عديدة) .

يخفف المخلوط إلى حجم معلوم بحيث يحتوى على أكثر من ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين لكل مل . ثم يرشح خلال ورق ترشيح (فى حالة صعوبة الترشيح يمكن اجراء الطرد المركزى والترشيح خلال fritted glass أو إى منهما) . ثم يؤخذ جزء صغير من الراشح الرائق ويختبر لوجود البروتينات الذائبة بإضافة نقطة من حمض HCl مخفف ، فإذا لم تظهر رواسب يضاف محلول NaOH مخفف مع الرج بقوة وتضبط درجة الـ p^H إلى ٦.٨ ، ويكمل حجم النهائى بحيث يحتوى على حوالى ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين لكل مل . وإذا كان هناك إى تعكير فى المحلول يرشح مرة أخرى . وفى حالة ظهور رواسب مع حمض HCl المخفف (بعد خطوة الترشيح الأولى) ، يضبط المحلول مرة أخرى إلى النقطة التى عندها تعطى أقصى ترسيب ، ثم يخفف إلى حجم يحتوى على أكثر من ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين لكل مل ، ثم يرشح ويؤخذ منه جزء ليختبر لتكون الرواسب فيه . ثم تضبط الـ p^H إلى ٦.٨ بمحلول NaOH مخفف كما سبق ذكره . لو كان محتوى الريبوفلافين فى العنية أقل مما ينبغى أن يكون طبقاً لحساسية هذه الطريقة ، فإنه يتم تركيز المحلول الرائق المتحصل عليه على درجة p^H ٤,٥ إلى حجم مناسب باستخدام الحرارة وتحت تفريغ ، ثم يرشح إذا دعت الضرورة وبعد ذلك تضبط درجة الـ p^H إلى ٦,٨ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ – بالنسبة للمواد الجافة والنصف جافة التى تحتوى على كميات محسوسة والتى يمكن ادراكها من المواد الأساسية : – تضبط درجة الـ p^H للمخلوط الى ٥,٠ – ٦,٠ بواسطة حمض HCl مخفف ثم تضاف كمية من الماء حتى يكون الحجم الكلى للمحلول (بالمل) يعادل ١٠ مرات أو أكثر من وزن المادة الجافة بالجم (يجب أن يكون المحلول الناتج يحتوى على ٠,١ ملجم ريبوفلافين لكل مل أو أقل) ، ثم يضاف ما يعادل ١,٠ مل حمض HCl(تركيزه ١٠ N) لكل ١٠٠ مل من المحلول ثم يعامل كما سبق ذكره فى الخطوة (١).

٣ – بالنسبة للمواد السائلة : – تضبط درجة الـ p^H إلى ٥,٠ – ٦,٠ بواسطة حمض Hcl مخفف أو بواسطة محلول NaOH المخفف مع الرج بشدة ثم تطبق الخطوات كما سبق ذكرها فى الخطوة رقم (٢) .

٤ – بالنسبة للمركزات concentrates والأضافات عديدة الفيتامينات premixes multivitamin supplements : – توضع وزنة معلومة بالضبط منها فى دورق ويضاف حجم من محلول الاستخلاص (جوهر رقم ٣) يعادل ١٠ أمثال (بالمل) وزن العينة بالجم أو أكثر بحيث يحتوى المحلول الناتج على ٠,١ ملجم ريبوفلافين لكل مل أو أقل . ولو كانت العينة غير قابلة للذوبان ، يتم الرج بشدة ، ثم تغسل جدران الدورق من الداخل بمحلول الاستخلاص وحتى يتم الاستخلاص على أحسن وجه يسخن مخلوط العينة مع محلول الاستخلاص تحت مكثف عاكس لمدة ساعة ثم يبرد . وإذا كان هناك تجمعات، فيتم الرج حتى تتفتت هذه التجمعات فى المحلول . يخفف المخلوط إلى حجم معلوم بواسطة محلول الاستخلاص ويسمح لأى حبيبات أن ترسب أو ترشح أو تطرد مركزياً لو أستدعى الأمر . يؤخذ جزء معلوم من المحلول الرائق ويجفف بالماء إلى حجم معلوم بحيث يحتوى على حوالى ٠,١ ميكروجرام ريبوفلافين / مل ، ويرشح إذا كان المحلول غير رائق ، ثم يقدر فيه محتوى الفيتامين كما فى الخطوة (د) .

ب – التقدير : –

١ – تجهز ٤ أنابيب أو أكثر (يمكن أستعمال أوعية تفاعل reaction vessels) ويضاف إلى كل منها ١٠ مل من محلول العينة (لو كان الفلورومتر يلزمه tubular cuvettes ، فيمكن أجراء كل التفاعلات فيها) .

٢ – إلى أثنين من هذه الأنابيب يضاف مل واحد من محلول الريبوفلافين القياسى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

working I (جوهر ١ – جـ) ، ويخلطا جيداً . وإلى الأنبوبتين الأخريين يضاف مل واحد ماء ويخلطا جيداً .

٣ – يضاف لكل أنبوبة مل واحد حمض خليك وتخلط جيداً ثم يضاف مع الخلط ٠,٠٥ مل محلول برمنجات بوتاسيوم ٤,٠ ٪(قد يزيد هذا الحجم لمحلول العينات التى تحتوى على كميات زائدة من المواد القابلة للأكسدة ، ولكن ٠,٠٥ مل أو أقل عادة ما تكون كافية لأكسدة المواد الغريبة) .

٤ – تترك الأنابيب لمده دقيقتين ثم يضاف لكل أنبوبة مع الخلط ٠,٠٥ مل محلول H_2O_2 ٣,٠ ٪ ، ولابد أن يزول لون البرمنجات خلال ١٠ ثوان .

٥ – ترج الأنابيب بقوة حتى يخرج الأكسجين الزائد ، ولو كان هناك فقاقيع غاز على السطح الداخلى للأنابيب بعد توقف الفوران يتم إزالتها بقلب الأنابيب ببطء .

٦ – تقاس فلورة محلول العينة التى تحتوى على مل واحد من محلول الريبوفلافين القياسى working I فى جهاز الفلورومتر ولتكن القراءة هى (X) ، ثم تقاس فلورة محلول العينة التى تحتوى على مل واحد ماء ولتكن القراءة هى (B) ، يضاف مع الخلط ٢٠ ملجرام مسحوق $Na_2S_2O_4$ إلى أنبوبتين أو اكثر ثم تقاس الفلورة خلال ٥ ثوان ولتكن القراءة هى (C) .

حـ – الحساب : –

يحسب تركيز الريبوفلافين من المعادلة التالية : –

$$\text{mg Riboflavin / ml final sample solution} = \left[\frac{(B-C)}{(X-B)}\right] \times 0.10 \times 0.001$$

ملحوظات : –

١– لابد أن تكون قيمة $\left[\frac{(B-c)}{(X-B)}\right]$ تساوى ٠,٦٦ أو أكثر ، ولاتزيد عن ١,٥ .

٢ – كمية $Na_2S_2O_4$ أكثر من ٢٠ ملجم ربما تختزل الصبغات الغريبة أو المواد المتفلورة الغريبة أو كلاهما معاً لذلك فهى تسبب نتائج خاطئة .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

د - التقدير البديل : -

يطبق هذا التقدير فى حالة العينات ذات المستوى العالى من الريبوفلافين .

١ - إلى خليتين قياس أو أكثر يضاف ١٠ مل من محلول العينة وإلى خليتين أخرتين يضاف ١٠ مل من محلول الريبوفلافين القياس working II (جوهر رقم ١ - د)، ثم يضاف مل واحد حمض خليك إلى كل أنبوبة ، و تخلط المحتويات جيداً .

٢ - تقاس فلورة الأنابيب كلها ، ثم يضاف مع الخلط ٢٠ ملجم مسحوق $Na_2S_2O_4$ إلى أنبوبة واحدة من أنبوبتى العينة وإلى أخرى من أنبوبتى المحلول القياسى ، ثم تقاس الفلورة خلال ٥ ثوان .

٣ - يحسب التركيز من هذه المعادلة : -

$$\text{mg Riboflavin / ml final sample solution} = \left[\frac{(I - Q)}{(I' - Q')}\right] \times 0.1 \times 0.001$$

حيث أن : -

I و 'I = هى كثافة الفلورة فى كل من محلول العينة والمحلول القياسى على التوالى

Q و ' Q = هما فلورة محلول العينة والمحلول القياسى بعد اضافة $Na_2S_2O_4$ على التوالى .

تقدير الريبوفلافين فى البول (Slater and Morell , 1946)

الأساس النظرى للتقدير :-

يستخلص الريبوفلافين من حجم معلوم من العينة بواسطة مخلوط من حمض الخليك و البيريدين والبيوتانول ، وبعد أكسدة الصبغات البولية المتداخلة بالبرمنجات ، يقاس تركيز الريبوفلافين بطريقة فلورومترية .

الجواهر الكشافة : -

١ - حمض أكساليك جاف .

٢ - مخلوط بيريدين و حمض خليك (١ : ١)

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣ - محلول برمنجنات بوتاسيوم ٤٠ جم / لتر .

٤ - محلول فوق أكسيد الهيدروجين ١٠ حجم .

٥ - كحول ايزوبيوتايل نقى أو بيوتانول عادى نقى . ويجب اختباره قبل الاستعمال من حيث الفلورة فى الـ UV ، فإذا أعطى فلورة ، يجب اعادة تقطيرة .

٦ - كبريتات صوديوم لامائية .

٧ - محلول stock standard riboflavin (٤٠ ملجم / لتر) .

٨ - محلول working standard (١,٠ ملجم / لتر) : - يخفف ٢,٥ مل من محلول الـ stock إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ، ويضاف إليها ٤٠٠ ملجم حمض أكساليك .

الطريقة : -

١ - تجمع عينة البول لمدة يوم كامل (٢٤ ساعة) فى زجاجات معقمه ويضاف إليها ١٠٠ ملجم حمض أكساليك لكل ٢٥ مل بول و يجب تلافى تعرض العينة اثناء التحليل للضوء المباشر وضوء الشمس .

٢ - يؤخذ ٠,٥ مل بول و ٠,٥ مل محلول قياسى و ٠,٥ مل ماء (بلانك) فى ثلاث أنابيب اختبار بغطاء محكم ونظيفة تماماً .

٣ - يضاف إلى كل منها ٠,٥ مل مخلوط البيريدين وحمض الخليك .

٤ - يضاف نقطة من محلول البرمنجنات ، وترج جيد لمدة حوالى دقيقة واحدة .

٥ - يضاف بعد ذلك نقطتين من محلول فوق أكسيد الهيدروجين ، ثم ترج مرة أخرى. يجب أن يختفى لون البرمنحات خلال ثوانى قليلة ، فإذا لم تختفى تضاف نقطة اضافية من محلول فوق أكسيد الهيدروجين ثم يدفىء المحلول إلى ٢١° م حتى يختفى لون البرمنجات .

٦ - يضاف ١,٥ مل كحول أيزوبيوتايل أو البيوتانول العادى ، ثم تغطى الأنابيب وترج بشده لمدة حوالى دقيقة واحدة أو أكثر (٢٥ مره) .

٧ - تترك الأنابيب حتى تنفصل الطبقات . ثم تضاف كمية قليلة من كبريتات

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الصوديوم اللامائية ، وتحرك الأنابيب بين راحه اليدين بالدوران حتى تصبح طبقة الكحول رائقة ، وتترك لمدة دقيقة أو دقيقتين حتى تنفصل الطبقات تماماً .

٨ - ينقل ١,٠ مل من طبقة الكحول العلوية الرائقة فى أنبوبة القياس وتقاس الفلورة على طول موجة ٥٢٥ nm باستعمال طول موجة ٤٥٠ nm للإثارة excitation ، ويضبط الجهاز على الصفر باستعمال البلانك . يبقى مستخلص الكحول ثابتاً لمده ساعتين على الأقل .

٩ - وللحصول على قراءة الريبوفلافين الحقيقية (المحسنة) ، يتم تعريض مستخلص الكحول لضوء UV قوى لمده ٦٠ ق بعد أخذ القراءة الأولى ، ثم تقاس الفلورة الباقية من جديد . فالاختلاف بينهما يرجع إلى الريبوفلافين ، فكمية الفلورة الباقية تكون ثابتة نسبياً عند حوالى خمس (١/٥) القراءة الأولى فى معظم عينات البول المجمعة بدون جرعات زيادة loading doses من الريبوفلافين .

الحساب : -

يحسب الريبوفلافين فى البول من المعادلة التالية : -

$$\text{Urinary riboflavin (mg / l)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}}$$

التفسير : -

كمية الريبوفلافين المفرزة مع البول يومياً كثيراً ما تتأثر بمحتوى الطعام من الريبوفلافين ، ففى الحالة العادية يكون الخارج output منه ٠,٥ - ٠,٨ ملجم / يوم ، والأختبارات التى تعتمد على اعطاء جرعة ثابته من الريبوفلافين تعطى نتائج مرضية أكثر من تلك التى تجرى تحت الظروف القاعدية basal conditions ، فلو أعطى الشخص السليم١٦ ملجم ريبوفلافين لكل كيلوجرام من وزن الجسم بالحقن فى الوريد (i.v) ، فإنه على الأقل ٢٥٪ من هذه الجرعة يفرز خلال ٤ ساعات .

ومما هو جدير بالذكر إن التداخلات التى ترجع إلى وجود المواد التى لها خاصية الفلورة فى البول ، تحت هذه الظروف ، قد تسبب فى بعض الأحيان اضطراباً فى النتائج .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تقدير نشاط أنزيم Glutathione reductase فى كرات الدم الحمراء

(Sauberlich et al. ,1972)

يقدر نشاط هذا الأنزيم فى كرات الدم الحمراء التى سبق لها عملية تحلل haemolysis فى وجود الـ FAD أو عدم وجوده ، ويقاس النشاط سبكتروفوتومترياً بتقدير معدل استهلاك الـ $NADPH.H^+$ كما يلى : -

Apoenzyme + FAD ⟶ Haloenzyme

G-S-S-G + $NADPH.H^+$ ⟶ 2GSH + $NADP^+$

حيث أن : -

G-S-S-G هو الجلوتاثيون المؤكسد oxidised glutathione .

GSH هو الجلوتاثيون المختزل reduced glutathione .

ونشاط هذا الأنزيم هو انعكاس لمستوى الفيتامين فى كرات الدم الحمراء (مستوى الـ FAD) ، وتلك بدورها هى انعكاس لمستواه فى الجسم . ففى حاله نقص الفيتامين يزيد معامل نشاط هذا الأنزيم (Activity Coefficient ; AC) .

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول كلوريد صوديوم (١٥٠ m mol / لتر) .

٢ - محلول فوسفات بوتاسيوم منظم (١٠٠ m mol / لتر ، p^H ٧,٤) .

٣ - محلول $NADPH.H^+$ (٢ m mol / لتر) :- يذاب ١٦,٦ ملجم من ملح $NADPH.H^+$ رباعى الصوديوم فى ١٠ مل من محلول بيكربونات صوديوم (١٠ جم / لتر) ، ويستعمل هذا المحلول حديث التحضير .

٤ - محلول الجلوتاثيون المؤكسد (٧,٥ m mol / لتر) : -ويحضر يومياً أو وقت التقدير (حديث التحضير) بإذابه ٤٦ ملجم جلوتاثيون فى ٩,٩ مل ماء (مقطر مرتين DDW , double distilled water) و١٠٠ μl محلول هيدروكسيد صوديوم (١ mol / لتر) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٥ – محلول FAD (٣٠٠ μ mol / لتر) : – ويحضر بإذابة ٢,٤ ملجم من ملح FAD أحادى الصوديوم فى ١٠ مل DDW ، ويحضر أيضاً وقت التقدير .

٦ – محلول EDTA (٨٠ nmol / لتر) : ويحضر بأذابه ١,٥ جم ملح EDTA ثنائى البوتاسيوم فى ٥٠ مل DDW .

التكنيك : –

١ – **تحضير العينة للتقدير** : – تؤخذ عينة دم وردى من الشخص الصائم (أو الحيوان الصائم) باستعمال الـ EDTA أو الهيبارين heparin كعوامل مانعة للتجلط anticoagulants ، وبمجرد أخذ العينة تبرد فى حمام ثلجى . يؤخذ منها ٢٠٠ μl وتخلط مع ١,٠ مل محلول ملحى بارد cold saline (NaCl ٠,٩٪) فى أنبوبة طرد مركزى ، ثم يتم الطرد المركزى على حوالى ٣٠٠٠ rpm لمدة ١٠ ق ، ويزال المحلول الرائق منها . تعاد هذه الخطوة مرتين أو اكثر (غسيل كرات الدم الحمراء) . يضاف إلى رواسب كرات الدم الحمراء فى الحال وبسرعة وقبل التقدير ١,٥ مل DDW ، ثم تخلط جيداً ويعاد طردها مركزياً حتى نحصل على الـ dilute haemolysate . يوضع هذا المحلول فى حمام ثلجى حتى القيام بالتقدير .

٢ – **قياس النشاط الأنزيمى** : – يتم هذا التقدير فى أنبوبتى قياس (2 cuvettes) ، حيث يضاف إلى الأولى ١٠٠ μl محلول FAD وإلى الأخرى ١٠٠ μl DDW. ثم يضاف إلى الأولى ٢,٠ مل محلول فوسفات منظم و ٥٠ μl محلول EDTA و ١٠٠ μl haemolysate و ١٠٠ μl محلول جلوتاثيون . يتم خلط المحتويات جيداً ثم تترك على ٣٧ °م لمدة ٨ ق ثم يضاف إليها ١٠٠ μl محلول $NADPH.H^+$ ثم يقاس الانخفاض فى الامتصاص (ΔA_1) على طول موجة ٣٤٠ nm ضد الماء كبلانك بعد مدة ١٠ ق كحد أقصى. تعاد نفس الخطوات بالضبط على الأنبوبة الثانية حتى نحصل على ΔA_2 .

الحساب : –

تحسب نتائج معامل نشاط الأنزيم activity coefficient (AC) ، أو الزياده النسبية فى نشاط الأنزيم الناتجة من إضافة الـ FAD (in vitro) من المعادلة التالية : –

$$AC = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$$

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التفسير : -

من قيم الـ AC يمكن الاستدلال على حالة مستوى الفيتامين فى الجسم كما يلى : -

لو كانت الـ AC أقل من ١,٢ يكون مستوى الفيتامين مقبول ، ولو كان ١,٢ - ١,٤ تكون هناك حاله نقص بسيط فى الفيتامين mild deficiency . أما لو زادت عن ١,٤ فتكون هناك حاله نقص معنوى . ومما هو جدير بالذكر ، إنه لا يمكن انجاز هذا الاختبار فى حاله معانة كرات الدم الحمراء من نقص أنزيم glucose - 6 - phosphatase .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فيتامين ب٦ (البيريدوكسين) - Vit.B_6 (Pyridoxine)

R
HO
CH_2OH
H_3C
N

تضم مجموعة فيتامين ب ٦ ثلاث أعضاء توجد كلها فى الطبيعة ، وهى من الناحية الكيميائية مرتبطة بعضها ببعض ، وتتكون من البيريدوكسين نفسه والبيريدوكسامين pyridoxamine والبيريدوكسال pyridoxal . وتعتبر كلها مشتقات للبيريدين pyridine . وتركيبها الكيميائى يختلف فقط فى نوع المجموعة R المرتبطه بالحلقة كما يلى : -

R
HO
CH_2—O—{ H, vitamin / PO_3H_3 . phosphate
H_3C
N

R = CH_2OH – فى حالة البيريدوكسين

= CH_2NH_2 – فى حالة البيريدوكسامين

= CHO – فى حالة البيريدوكسال

وإى صورة غذائية للفيتامين توجد فى صورة أسترات الفوسفات 5-phosphate esters ، فإنها تتحلل مائياً بفعل أنزيم intestinal alkaline phosphatase قبل أمتصاصها الى صورة حرة ، وهى تتحول إلى pyridoxal - 5 - phosphate (PLP) والذى يعتبر معاون coenzyme لأنزيمات عديدة تدخل فى التمثيل الغذائى للبروتين والدهون والكربوهيدرات ، ومن اهمها أنزيمات الـ transaminases والـ decorboxylases . أيضاً الـ PLP معاون أنزيمى لأنزيم kynureninase (EC.3.7.1.3) والذى يحفز تفاعل تحويل الـ kynurenine

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

والـ 3- hydroxynurenine إلى 3- hydroxyanthranilic acid و anthranilic acid ، على التوالى ، وذلك أثناء هدم الحمض الأمينى التربتوفان tryptophan .

وعند نقص البيريدوكسين ، يقف هـــذا التفـــاعـــل (شـــكل ٣٣) ويــفرز كل من الـ xanthurenic acid والـ kynurenic acid فى البــول . فكـــلاهما يتحــول جـــزئياً إلى 8 - hydroxyquinaldic acid و quinolinic acid ، على التـــوالى . الـ PLP يلزم أيضاً لتخليــق δ- aminolaevulinic acid من glycine و succinyl CoA فى بداية تخليق الهيم haem . وناتج التكسير الرئيسى لهذا الفيتامين ومشتقاته هو 4- pyridoxicacid ويشتق بأكسدة مجموعة الألدهيد فى البيريدوكسال الى مجموعة كربوكسيل ، ويفرز فى البول .

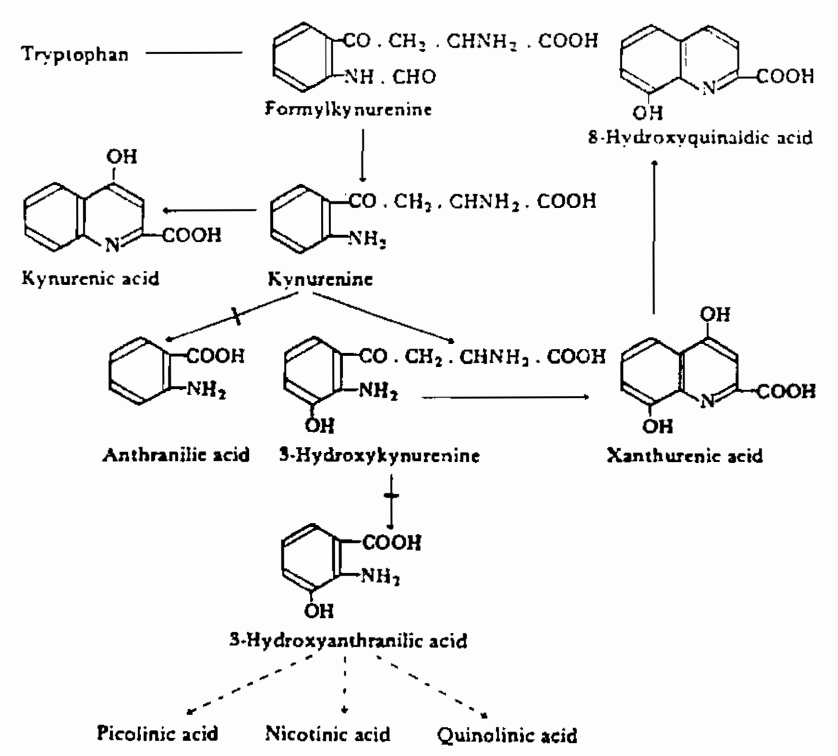


Fig. 35.1. The Catabolism of Tryptophan via the Kynurenine Pathway.
The blocks in pyridoxine deficiency are indicated by bars on the arrows.

شكل (٣٣) هدم التربتوفان خلال مسـار الـ Kynurenine ، وفى حالة نقص البيريدوكسين يتوقف تفاعل تحويل الـ Kynurenin إلـى Anthranilic acid وتفـاعل تحـويل الـ 3 - Hydroxykynurenine الـى 3 - hydroxyanthranilic acid والتى يشار اليها بخط مستعرض على السهم الخاص بالتفاعل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تفاعلاته :-

فيتامين ب ٦ ثابت لكل من الحرارة والقلويات والأحماض ، وغير ثابت فى الوسط المؤكسد والوسط المختزل ، وحساس للضوء . وفى الماء يكون تأثيره قلوياً (قاعده نيتروجينيه هيدروكسيلية ضعيفه) .

الذوبان :

يذوب فى الماء بنسبة كبيرة (٠,٢ جم / مل) ، ويذوب أيضاً فى الأستيون والكحول . ولكنه غير ذائب فى المذيبات الغير قطبية مثل البنزين والأيثير والكلوروفورم .

صوره وخواصه :

مسحوق أبيض (الصورة النقية) ، أما الصورة البللورية فهى على شكل صفائح platelets . أهم أملاحه هى ملح الهيدروكلوريد وملح الكالسيوم Ca^{++} . الوزن الجزيئى يبلغ ١٦٩ (بيريدوكسين) ودرجة أنصهارة هى ١٦٠ ° م . أقصى أمتصاص له على طولى موجة ٢٥٦ و ٣٢٧ nm .

انتشاره ومصادره :

١ - **فى النباتات** :- كل الفواكه تحتوى على كميات صغيرة منه ماعدا الموز ، أما الأفوكادو avocados والعنب والكمثرى pear فهى تحتوى على كميات متوسطة منه . وكل الخضروات تحتوى على كميات صغيرة أو متوسطة منه . وكل النقل تحتوى على كميات عالية منه . ويوجد فى الحبوب بكميات متوسطة عدا الأرز البنى وجنين القمح فهما يحتويان على فيتامين ب ٦ بكميات كبيرة ، ويحتوى المولاس أيضاً على كميات كبيرة منه .

٢ - **فى الحيوانات** :- كل الحيوانات تحتوى على كميات متوسطة منه عدا الكبد والسالمون والرنجة ففيهما كميات عالية منه .

٣ - **الكائنات الحية الدقيقة** :- كل أجناس الكائنات الحية الدقيقة تحتوى على كميات عالية أو متوسطة منه ، والخميره وبكتريا الأمعاء الدقيقة وبعض الأجناس الأخرى تحتوى على كميات عالية منه .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادرالغنية** :-(١٠٠٠ - ١٠٠٠٠ µg لكل ١٠٠ جم) وتشمل الكبد

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

https://scholar.google.com/citations?user=t1aAacgAAAAJ&hl=en

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.facebook.com/groups/
/Biothesis

https://www.researchgate.net/profile/
/Salam_Ewaid

07807137614



(كبد البقر والعجل والخنزير) ، والسالمون والرنجة ، وجنين القمح والأرز البنى ، والفول السودانى والجوز walnut ، والخميرة والمولاس .

٢ - **المصادر المتوسطة** : - (١٠٠ - ١٠٠٠ µg لكل ١٠٠ جم) وتشمل الموز والعنب والأفوكادو والكمثرى والشعير والجوز والذرة والبسلة والبطاطس والراى والشوفان والكرنب والطماطم والقنبيط والسبانخ وفول الصويا ، واللحم (البقر والخنزير والضانى) ، وفى والعجول veals (القلب والكلى والمخ) ، و فى الحوت والماكريل والسردين والتونا والبيض .

٣ - **المصادر المنخفضة** : - (١٠ - ١٠٠ µg لكل ١٠٠ جم) وتشمل التفاح والجريب فروت والليمون والكنتالوب والبرتقال والفروالة والبطيخ والكريز والفول والخس والبصل والأسبراجس والجبن واللبن .

الدور الطبي والغذائى :

١ - **الوحدات** :- وحدات فيتامين ب ٦ بالوزن ملجم mg وميكروجرام µg .

٢ - **المستويات الطبيعية فى الدم** : - ١١,٢ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل .

٣ - **المقررات الموصى بها** : - ٢,٠ ملجم / يوم . أما للحوامل والمرضعات فيوصى بـ ٢,٥ ملجم / يوم .

٤ - **أعطاء الفيتامين** :- يفضل اعطاءه عن طريق الفم ، ويمكن اعطاءه بالحقن سواء تحت الجلد أو فى الوريد .

٥ - **أعراض النقص** : -

أ - **أعراض عامة** : - أنيميا ، وزيادة افراز xanthurenic acid فى البول ، وخلل عصبى متضمناً تشنجات convulsions ، وأضرار جلدية .

ب - **فى حيوانات التجارب** : - زيادة مستوى اليوريا فى الدم وفى البول ، وانخفاض الهيموجلوبين والجاما جلوبيولين α - globulin ، و زيادة الأكسالات فى البول ، وانخفاض الأنسيولين ، وعجز القدرة على التناسل .

٦ - **تأثير الجرعات العالية منه** : - سميته محدودة على الإنسان (فقط على جرعة ٣ جم / كجم من وزن الجسم) ، ولكن يحدث تشنجات عصبية عند اعطاءه

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بجرعة ٤ جم لكل كجم (فى الفئران) .

٧ - **مصادره للأجناس التى تحتاج إليه** :- كل الحيوانات تحتاج إليه من المصادر الخارجية ، وبعض البكتريا (البكتريا المعوية) تخلقة ولكن ليس كله متاح للإنسان ، أما النباتات والفطريات والبكتريا المعوية فهى تخلقه بداخلها (مصدر داخلى) .

تحليل فيتامين ب ٦

الفصل :

يعتبر رجيع الكون ونواتج تبيض الأرز والخميرة من أهم المصادر التى يستخلص منها هذا الفيتامين ، والطريقة المتبعة فى الأستخلاص تتضمن تحليل مائى للعينة بمحلول حامضى (HCl قوته أقل من عيارى N) ، ثم أدمصاص الفيتامين على فحم نشط أو fuller's earth، ويلى ذلك أحلال الفيتامين بأيدروكسيد الباريوم ثم ترسيب المواد المتداخلة والمحله مع الفتيامين بأيونات المعادن الثقيلة . وأخيراً يرسب فيتامين ب ٦ بحمض فوسفوتنجستيك .

طرق التقدير :

لابد أن تكون الطرق المستخدمة فى تحليل فيتامين ب ٦ كمياً قادرة على الكشف عن كل صور الفيتامين ، وأيضاً تكون حساسة ودقيقة فى تقدير كميات صغيرة منه (نانوجرامات) فى وجود مواد متداخلة عديدة مع الفيتامين . وحيث أن الفيتامين يوجد فى النظم الحيوية مرتبطاً بالبروتين ، فلابد من تحليله مائياً أولاً ثم استخلاصه .

والتقدير الحيوى باستخدام الحيوانات يتضمن استخدام إما الفئران أو الدجاج ، وفيها تغذى الحيوانات على عليقة أساسية فقيرة فى الفيتامين ، وبعد الحصول على أعراض النقص تضاف كميات معلومة منه فى العلقية ويسجل معدل النمو المصاحب لهذه الزياده (عامل الأستجابة هو النمو) . وحيث أن هذه الطريقة تستلزم كثيراً من الوقت وغالية التكاليف وتعطى نتائج متغيرة variable ، لذا فلا يفضل استخدامها وتستخدم الطرق الأخرى فى التقدير . ومما هو جدير بالذكر ، يستخدم عد كرات الدم الحمراء فى التقدير الحيوى للفيتامين. ومن أهم التقديرات الحيوية أيضاً كل من rat acrodynia test, tryptophan loading test ، والطريقة القياسية للتقدير الكمى لفيتامين ب ٦ فى الأغذية هى الطريقة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الميكروبيولوجية ويستخدم فيها خميرة Saccharomyces uvarum ، و ميزة هذه الطريقة أن صور الفيتامين المختلفة (بيريدوكسال ، بيريدوكسين ، بيريدوكسامين) ذات نشاط متساوى على هذا الميكروب (على أساس جزيئى molar basis) . وفيها لابد من اجراء تحليل مائى أولاً وقبل التقدير حتى يمكن التخلص من البروتين والفوسفات لأن هذه الخميرة تنمو فقط على الصورة الحرة للفيتامين . وعادة ما تعلق suspend العينة فى حمض HCl ثم تعقم فى الأتوكلاف ، والطريقة الرسمية AOAC تتضمن استخدام حمض HCl قوته ٠,٤٤ N للعينات النباتية و ٠,٥٥ N للعينات الحيوانية . ويتم تسخين العينات النباتية فى الأتوكلاف على ١٢١ ° م لمده ساعتين والعينات الحيوانية لمدة ٥ ساعات . وهناك طرق أخرى تستخدم للتحليل المائى. وتقاس أستجابة الكائن الحى الدقيق للنمو فى بيئة أساسية خالية من فيتامين ب ٦ وتقارن مع مجموعة بهما كل الأضافات القياسية وأخرى بها أضافات العينة المجهولة فى نفس البيئة .

بعض الباحثين أمكنهم تقدير صور الفيتامين المختلفة كل على حده فى عينات الأغذية المحللة مائياً . فاستخدمت البكتريا L. casei فى تقدير البيريدوكسال كمياً ، واستخدمت Strep. faecali لتقدير البيريدوكسال والبيريدوكسامين معاً . واستخدمت S. uvarum لتقدير فيتامين ب ٦ الكلى . ومن أهم الاعتراضات على الطرق الميكروبيولوجية مايلى :-

١ – هذه الطرق تستهلك وقتاً طويلاً .

٢ – وجود اختلافات فى الأستجابة للنمو للفيتامين باختلاف أنواع الكائنات الحية الدقيقة.

٣ – قد تحدث عملية طفرة للكائنات الحية الدقيقة .

٤ – قد تكون صور الفيتامين غير متاحة ميكروبيولوجياً نتيجة للاستخلاص بالحمض .

٥ – قد يكون نمو الميكروب مرتبطاً ببعض المواد المستخلصة من الطعام مع الفيتامين .

واستخدم الـ GLC فى السنين الأخيرة للكشف عن فيتامين ب ٦ وتقديره أيضاً . وففى بعض هذه الطرق يتم تحضير مشتقات الـ trimethyl silyl (TMS) للفيتامين ، وقد أعطت هذه الطريقة فصلاً جيداً ونتائج يعتمد عليها . و قد أمكن استخدام المشتقات التالية للفيتامين والتى اعطت فصلاً جيداً وتشمل :-

N-methyl bistrifluoroacetamidyl و heptafluorobutyl و acetyle و trifluoroacetyl .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حديثاً استخدام الـ HPLC فى فصل وتقديرالفيتامين ، ومن أهم مميزاته السرعة واستخدامه لأقل كمية من الفيتامين (٥٠ ng) ، ويمكن فصل مشابهات الفيتامين المختلفة بهذا التكنيك وأعطى نتائج أفضل بكثير من نتائج الطرق الميكروبيولوجية . وأمكن فصل الصور المفسفرة والغير مفسفرة من الفيتامين باستخدام أعمدة تبادل آيونى فى الـ HPLC . ويجب مراعاه نظافة العينة تماماً وخلوها من المواد المتداخلة عند تطبيقها فى هذه الطريقه . هذا ، وتعتبر هذه الطريقة هى الطريقة المختارة والجيدة لفصل صور الفيتامين المختلفة بكفاءة عالية

أخيراً ، تستخدم الخاصية الكيميائية الطبيعية (الفلورة) لمركب 4 - pyridoxic acid (الناتج الرئيسى لهدم فيتامين ب٦) لتقديره فى البول .

الطريقة الفلورومترية لتقدير xanthurenic acid فى البول

(Satoh and Price ,1958)

فى هذه الطريقة يتم ادمصاص كل من xanthurenic acid , kynurenic acid على المبادل الآيونى Dowex 50W فى صورة H^+ ، فى عمود كروماتوجرافى ، ثم يتم احلالها فقط بالماء وتبقى باقى المواد المتداخلة مرتبطة مع المبادل بدون احلال . ويقاس xanthurenic acid فلورومترياً فى محلول قلوى ، بينما فلورة kynurenic acid فتكون طفيفة جداً لدرجة أنه يمكن اهمالها .

الجواهر الكشافة : -

١ - المبادل الآيونى : - Dowex 50W (H^+ form) . α 400 mesh .

٢ - محاليل حمض HCl :- ٥ mol / لتر ، ١ mol / لتر ، ٢٠٠ m mol / لتر .

٣ - محلول فوسفات منظم (٥٠٠ m mol / لتر ، p^H ٧,٤) : - يذاب ١٣,٠٠ جم KH_2PO_4 لامائية ، و ٧١,٩٧ جم من $Na_2HPO_4.2H_2O$ فى ماء ويكمل الحجم إلى لتر . تختبر درجة الـ p^H وتضبط إلى ٧,٤٠ إذا اقتضت الضرورة .

٤ - محلول فوسفات منظم مخفف (٥ m mol / لتر ، p^H ٧,٤) : - يخفف الجوهر رقم ٣ بنسبة حجم إلى ١٠٠ حجم بالماء المقطر .

٥ - محلول هيدروكسيد صوديوم مشبع .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٦ – محلول stock standard xanthureinc acid (١ جم / لتــر) :- يذاب ١٠٠ ملجم من الحمض فى ١٠٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (١٠٠ m mol / لتر) .

٧ – محلول working standard xanthurenic acid (١٠ ملجم / لتر) : - يخفف الجوهر رقم ٦ بنسبة حجم إلى ١٠٠ حجم بالماء المقطر قبل الاستعمال .

التكنيك : -

١ – تستخدم أعمدة كروماتوجرافية زجاجية ، ويفضل عمود بطول ١٥ سم وقطر خارجى قدره ١,٢ سم . توضع سدادة من الصوف الزجاجى أعلى صنبور العمود ، ثم يضاف معلق المبادل الآيونى حتى ارتفاع ٣ سم من العمود .

٢ – يغسل المبادل بـ ٥٠ مل محلول حمض HCl (٥ mol / لتر) ، ثم يتبع ذلك الغسيل بـ ٢٠٠ مل ماء .

٣ – تؤخذ عينتان (duplicate) من البول ، عادة ٥٪ من حجم البول الكلى خلال ٢٤ ساعة ، ويقل الحجم إلى ٢٪ فى حالة التركيزات العالية .

٤ – إلى أحد العينتين يضاف ١,٠ مل من محلول stock standard (١ملجم من حمض xanthurenic acid)حتى تختبر قدرة المبادل على الاستعادة recovery.

٥ – تخفف العينتين إلى ١٢٠ مل بالماء المقطر ثم يضاف ٣٠ مل حمض HCl (١ mol / لتر) وتخلط جيداً .

٦ – يضاف كل محلول (كل على حده) إلى الأعمدة الكروماتوجرافية التى سبق تجهيزها ، ويسمح للمحلول بإن يمر خارج العمود ، ثم يغسل كل منها بـ ٥٠ مل حمض HCl (٢٠٠ m mol / لتر) ويتبع بالغسيل بـ ٢٠ مل ماء مقطر .

٧ – يتم الاحلال لكل عمود بواسطة ٣٩٦ مل ماء مقطر ، ويضاف لكل من المحاليل المحلة eluats ٤ مل محلول فوسفات منظم (٥٠٠ m mol / لتر) .

٨ – يؤخذ ١ و٢ و ٤ مل من كل مخلوط ويضاف إليها محلول فوسفات منظم إلى حجم نهائى قدره ٥ مل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٩ – تحضر المحاليل القياسية كمايلى : – يخفف ١,٠ و ٥,٠ و ١,٠ و ٢,٠ مل من محلول working standard ويخفف إلى ٥ مل بمحلول الفوسفات المنظم وبذلك نحصل على تركيزات ٢,٠ و ١ و ٤ ملجم / لتر .

١٠ – يضاف إلى كل منها (العينات والمحاليل القياسية) ٥ مل محلول هيدروكسيد صوديوم مشبع ، و يخلط جيداً و يترك على الأقل لمدة ساعة ، ثم يطرد مركزياً وتقاس الفلورة ضد بلانك يتكون من محلول هيدروكسيد صوديوم نصف مشبع على طول موجة إنبعاث emission مقدراها ٥٢٥ nm وطول موجه إثارة excitation مقدراها ٣٧٠ nm .

الحساب : –

لو كان حجم المحلول الذى تم احلاله هو V مل والذى خفف إلى ٥ مل ، فإن تركيزxanthurenic acid فى المحلول المحل يحسب من المعادلة التالية : –

$$\text{Elute concentration (mg / l)} = \frac{\text{Read of unknown}}{\text{Read of standard}} \times \text{concentration of standard} \times \frac{5}{V}$$

ولو كانت X هى النسبة المئوية المأخوذة من حجم البول خلال ٢٤ ساعة فيحسب تركيز الحمض فى الـ ٢٤ ساعة من المعادلة التالية : –

$$\text{Urinary xanthurenic acid (mg / 24 h)} = \text{concentration in eluate} \times \frac{40}{X}$$

ملاحظات : –

١ – حتى تكون هذه الطريقة سليمة ١٠٠٪ ، فلابد من الحصول على استرجاع recovery للحمض المضاف بنسبة ٩٥ ± ٥ ٪

٢ – بالرغم من أن فلورة الـ kynurenic acid تكون فى المحلول الحامضى إلا أن فلورته فى الوسط القلوى تكون بسيطة جداً ، ويمكن إهمالها ، وتدخله غير محتمل فيما عدا فى حالات أفرازه بكميات كبيرة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

اختبار تحمل التربتوفان

Tryptophan loading test (Price et al ., 1965)

١ - بعد تجميع البول ليوم كامل (٢٤ ساعة) ، يعطى الشخص ٢ جم حمض أمينى تربتوفان L- tryptophan في عصير برتقال ، وفى حالة الأطفال الصغيرة يعطى الفرد ٠,١ جم لكل كجم من وزن الجسم و بحد أقصى ٢ جم ، ثم يجمع البول المفرز خلال ٢٤ ساعة التالية لاعطاء التربتوفان فى زجاجة خاصة تحتوى على ٢٥ مل حمض HCl (١ mol / لتر) .

٢ - يقدر xanthurenic acid فى عينه البول .

٢ - حيث أن أقصى زيادة فى افراز xanthurenic acid تحدث فى أول ١٢ ساعة بعد تناول التربتوفان ، لذلك تجمع عينات البول قبل وبعد هذه الزيادة بـ ٦ ساعات .

التفسير : -

يفرز الشخص العادى ١ - ٣ ملجم xanthurenic acid يومياً ، ومن ٢ إلى ١١ ملجم فى خلال ٢٤ ساعة بعد تناول جرعة التربتوفان . وفى حالة نقص البيريدوكسين تكون الاستجابة للتربتوفان كبيرة ويصل المفرز من الحمض إلى ٦٠ ملجم فى خلال ٢٤ ساعة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Niacin – النياسين

Niacin **Nicotinamide**

النياسين أو حمض النيكوتينيك nicotinic acid في صوره الأميد يسمى نيكوتيناميد nicotinamide ، وهو مكون رئيسى لمعاونين أنزيمين مهمين وهما nicotinamide adenine dinuclotide (NAD^+) , nicotinamide adenine dinuclotide phosphate ($NADP^+$).

وهـــذين الصـــورتين يوجـدا فى مـعظم الخـلايا ويمثـلا العـوامل المسـتـقبلة للهـيـدروجين hydrogen acceptors لعديد من أنزيمات الأكسدة والاختزال oxido reductases .

يوجـد حـمض النيكوتينيك والنيكوتيناميـد فى الغـذاء ويمتص بسـرعـة من الصـائم jejunum (الجزء الأوسط من الأمعـاء الدقيقة) ويظهر فى الدم وفى سائل النخـاع الشـوكى cerebrospial fluid و يخـزن جـزء صـغيـر منه كـمـا هو ، ولكن مـعظم الخـلايا تحـوله إلى معاونات أنزيمية NAD^+ و $NADP^+$. تكسيـر هذه المعـاونات الأنزيميـة يتم بواسطة الـ microsomal deaminase وتطلق منه حمض النيكوتينيك والذى يفرز فى البـول أسـاسـاً فى صورة l-methylnicotinamide وكـمـيـة بسـيطة من 1-methyl-3-carboxamide-6-pyridone .

تفاعلاته :

ثابت للعوامل التالية : – الحرارة و الحمض و القلوى و الأكسدة والضوء ، ولكنه غير ثابت ضـد العـوامل المخـتـزلة ، وعند ذوبانه فى الماء يكون تأثيـره حـامضـى ويكون أمـلاح مع الأحماض (HCl) ومع المعادن Na (مع الكربوكسيل) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الذوبان :

يذوب فى الماء بنسبة كبيرة (١ جم / ١٠٠جم) ، وفى الكحول ، ولكنه غير ذائب فى المذيبات الغير قطبية .

صوره وخواصه :

صورته البللورية بيضاء أبرية ، والوزن الجزيئى له ١٢٣,١ ، ودرجة أنصهاره ٢٣٤ - ٢٣٧ ° م ، وأقصى امتصاص على طول موجة ٢٦١,٥ nm ، وهو غير منشط ضوئياً .

انتشاره ومصادره :

١ - **فى النباتات** :- كل الفواكه تحتوى على كميات صغيرة منه عدا الأفوكادو ، والتين الجاف والبلح dates والخوخ الجاف prunes فيوجد فيها بنسبة متوسطة . وكل الخضروات تحتوى أيضاً على كميات صغيرة منه عدا الفول والحمص والبطاطس والأسبراجس والذرة والبقدونس parsley والكرنب فتحتوى على كميات متوسطة منه . وكل النقل تحتوى على كميات متوسطة منه عدا البكان وجوز الهند فهى فقيرة فيه .

٢ - **فى الحيوانات** :- كل الحيوانات تحتوى على كميات متوسطة منه عدا الكبد والكلى والقلب ولحم الرومى والدجاج (الأبيض منه) والأرانب والتونا وسمك أبوسيف swodfish فإنها تحتوى على كميات عالية منه .

٣ - **الكائنات الحية الدقيقة** :- كلها تحتوى على كميات عالية منه .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادرالعالية** :-(١٠ - ١٠٠ ملجم / ١٠٠ جم) وتشمل النقل و الكبد (بقر - عجل - دجاج - خنزير - ضأن) و القلب (عجل) و الكلى (بقر - خنزير) و لحم الأرانب والرومى والدجاج (الأبيض) و مستخلص اللحم و التونا وسمك أبوسيف والخميرة .

٢ -**المصادر المتوسطة** :-(١ - ١٠ ملجم / ١٠٠ جم) وتشمل الأفوجادو والبلح و التين (الجاف) والخوخ (الجاف) والفول والذرة والأسبراجس والبقدونس والحمص والبطاطس وفول الصويا والشعير والقمح والراى rye والشوفان والأرز البنى وجنين القمح

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

والمولاس . كما يوجد فى لحم البقر والدجاج (اللحم الغامق) والبط والضـأن والسمك (عدا التونا وأبوسيف) .

٣ - **المصادر المنخفضة** : - (٠,١ - ١,٠ ملجم / ١٠٠جم) وتشمل التفاح والموز والفراولة والكريز والليمون والجريب فروت والبرتقال والبطيخ والخوخ والبلح و البنجر والكرنب والجزر والقرنبيط والباذنجان والخس والبصل والسبانخ والبطاطا والطماطم والفجل وجوز الهند والبكان و البيض واللبن .

الدور الطبى والغذائى:

١ - **وحدات النياسين** : بالوزن (ميللى جرام) .

٢ - **المستويات الطبيعية فى الدم** :- ٠,٤٢ - ٠,٨٤ ملجم / ١٠٠ مل .

٣ - **المقـررات الموصى بهـا** : - يوصى للأطفـال بـ ٨ - ١٥ ملجم / يوم ، وللبـالغين الذكـور ١٨ ملجم / يوم ، وللأناث ١٣ ملجم / يوم . والنسبة للحوامل فيوصى بـ ١٥ ملجم / يوم ، وللمرضعات يوصى بـ ٢٠ ملجم / يوم .

٤ - **اعطاءه** : - يفضل اعطاءه عن طريق الفم ، كما يعطى بالحقن فى الوريد .

٥ - **أعراض النقص** : -

أ - الأعراض العامة فى الإنسان : -البلاجرا pellagra و نقص النمو وضعف الجسم (هزال) weakness وضعف الذاكرة و التهاب جلدى dermatitis وفقد الشهية للطعام anorexia و عسر الهضم indigestion واسهال diarrhea و كسل lassitude والاصطباغ pigmentation وسرعة الغضب والاثارة irritability وصداع headaches وأرق insomnia .

ب - تغيرات هستولوجية فى الجهاز العصبى المركزى CNS (فى الكلاب والقطط) .

جـ - سيل اللعاب من الفم drooling (فى الكلاب والقطط) .

د - perosis وقلة الريش poor feathering (فى الدجاج) .

٦ - **مصادره للأجناس التى تحتـاج إليه** :- كل الأجناس تحتـاج إليه . ومصادره هى : -

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أ - **المصادر الخارجية** :- يلزم مد الحيوانات بمصدر خارجى من الفيتامين (غير متاح من بكتريا المعوية فى الإنسان) ، ولكن جزء من التربتوفان يتحول اليه فى الأنسجة ، كما يلزم مد البكتريا والفطريات به .

ب - **المصادر الداخلية** :- تخلقه النباتات والطحالب وبعض البكتريا والفطريات، كما تستطيع بعض أجناس الحيوانات أن تخلقه كلية من التربتوفان والبعض الأخر تخلقه جزئياً .

٧ - **تأثير الجرعات العالية** :- فى الإنسان : سميته محدودة تبدأ بجرعة حوالى ١,٤ جم لكل كجم من وزن الجسم مع حساسية تختلف من فرد لآخر ، و أنخفاض كولستيرول السيرم وكبد دهنى . حث الجهاز المركزى و زيادة معدلات التنفس والنبض pulse وأنخفاض ضغط الدم ، و حكة جلدية itching skin و تحرق burning و توسع الأوعية الدموية الخارجية vasodilation . وفى الفئران : تسبب حالة ketosis وشلل تنفسى respiratory paralysis . أما فى الكلاب فهى تسبب الموت . وفى الدجاج فهى تثبط النمو وتؤدى إلى تكوين كبد دهنى .

تحليل النياسين

الفصل :

١ - **حمض النيكوتينيك** Nicotinic acid :- يمكن فصل حمض النيكوتينيك بسهولة من المواد البيولوجية ، والطريقة المختارة تعتمد على نوع المادة وعلى الغرض من الفصل . فى معظم الحالات مع المواد الحيوانية ، عند الحاجة فقط إلى استخلاص حمض النيكوتينيك الحر فإنه يفضل أجراء تحليل مائى قاعدى . أما التحليل المائى الحامضى فإنه يحول بعض من حمض الكوينولينيك quinolinic acid الموجود فى الأنسجة أو عينة السيرم إلى حمض النيكوتينيك . وعلى ذلك فإنه يجب أولاً وقبل التحليل المائى اجراء استخلاص مبدئى بمذيب عضوى ، ثم استخلاص حمض النيكوتينيك بعد التحليل المائى بالمذيبات العضوية ، ثم تركز تحت تفريغ ويفضل تجفيفها تحت التفريغ أيضاً .

وهناك طرق أخرى تتضمن تكوين استرات أو أملاح النحاس والتى تسرع من فصله . وأبسط طريقة لفصل كميات صغيرة منه من البول تتضمن تحليل مائى قاعدى ثم تعادل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وتجفف ، ثم استخلاص البقايا بالميثانول . ويلى ذلك تجفيف المستخلص الميثانولى ، ثم يمرر على عمود يحتوى مبادل آيونى Dowex 50 - 8 فى محلول مائى ، ثم يحل بواسطة محلول HCl وبعد ذلك تركز المحاليل المحلة حتى الجفاف تحت تفريغ ، ويمكن أعادة بلورتها فى ٥٠٪ أيثانول .

٢ - النيكوتيناميد Nicotinamide : - الطريقة الشائعة المعروفة لفصل النيكوتيناميد هى الاستخلاص بالماء ثم التحليل المائى بحمض كبريتيك (٠,١ N) لتحرير النيكيوتيناميد من التركيبات الأنزيمية المتعددة . يستخلص هذا المحلول بكحول بيوتانول أو كلوروفورم ثم يقطر المستخلص (الذى يحتوى على النيكوتيناميد) جزئياً على ١٥٠ - ١٦٠ °م تحت ضغط ٥× ١٠ ⁻٤ ميليمتر زئبق mm Hg . ويمكن اعادة بللورة ناتج التقطير بالبنزين أو كلوروفورم أو أيثيلين جليكول ethylene glycol .

٣ - نيكلوتيدات البيريدين pyridine nucleotides : - تم فصل الـ NAD من خميرة الخبيز ومن كبد الغنم والعجول والبقر والخنزير ، ولكن أعلى انتاج تم الحصول عليه كان من الخميرة . والطريقة المناسبة لذلك هى الأستخلاص بالماء الساخن ثم التخلص من المواد المتداخلة من المستخلص بخلات الرصاص القاعدية ثم فصل الـ NAD من الراشح فى صورة ملح فضة . وهذا الملح يتحلل بواسطة كبريتيد الهيدروجين H_2S ، حيث تترسب الفضة وينوب الـ NAD ، ويتم ترسيب الأخير من الراشح بالأسيتون كحامض . ويمكن الحصول على نقاوة ٩٥٪ باستخدام كروماتوجرافى التبادل الآيونى على راتنج Dowex - 1 .

طرق التحليل :

١ - الطرق الميكروبيولوجية (للنياسين والنيكوتيناميد) :- وهى طريقة حساسه جداً لتقدير النياسين والنيكوتيناميد والمركبات التى على صلة بهما فى معظم العينات. وفيها يستخدم الكائن الحيوى الدقيق L. arbionosis . ويمكن تحليل عينات السيرم والبول والأغذية أو الأنسجة بهذه الطريقة .

٢ - الطرق الكيميائية : - وهذه الطرق أقل حساسية من الطرق الميكروبيولوجية وعادة ما تتطلب استخلاصاً للفيتامين أولاً ثم تنقيته . وهناك طريقتان تم التوصيه بهما لتقديره ، وكلاهما يستخدما الميتول metol (F-methylaminophenol sulfate) كقاعده عطرية تستعمل لاظهار لون مع النياسين . والطريقة الأولى تعتمد على تحليل مائى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حامضى والثانية تعتمد على تحليل مائى قاعدى لتحرير النياسين من العينة . أما الطريقة الرسمية فتعتمد على أستعمال حمض السلفانيليك sulfanilic acid كمظهر للون .

٣ - تحليل المستحضرات الطبية (نيكوتيناميد) : - وفى هذه الطرق تستخدم عينات نقيه ، وتتميز هذه الطرق بالبساطة والسهولة حيث يتم التفاعل مباشرة بين النيكوتيناميد فى وجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين مع بروميد السيانوجين cyanogen bromide و حمض . الباربيتيوريك barbituric acid (عامل مختزل) . وهذا التفاعل يعطى لون قرمزى purple والذى له اقصى أمتصاص على طول موجة ٥٥٠ nm .

٤ - الطريقة الدقيقة للتقدير السيرم٢٣٥ : - يمكن تحليل N' -methylnicotinamide chloride (NMN) والنيكوتيناميد فى السيرم بتركيزات صغيرة جداً picomolar . وهذه الطريقة فلورومترية وفيها يتم تحويل المركب الأول السابق ذكره والموجود فى مستخلص السيرم الخالى من البروتين إلى مشتق ذو فلورة بالمعاملة بواسطة acetophenone فى بوتاسا كاوية كحولية ثم أضافة حمض فورميك ٩٩٪ إلية . وأساس التفاعل هو أن N'-methylnicotinamide يتكثف مع الأسيتون فى الوسط القلوى المائى ويعطى مركب ذو فلورة عند معاملته بحمض مخفف . وعند أستبدال الأسيتون بالـ 2- butanone يعطى مشتق ذو فلورة أيضاً. وبذلك طورت الطريقة بأستخدام acetophenone لأنها تعطى علاقة خطية واضحة وحساسة عن المواد الأخرى بحوالى٢٠ ضعف .

٥ - تحليله فى البول : - وفى هذه الطريقة يتم أزالة المواد المتداخلة من البول على عمود راتنج ، ويمكن أزالتها أيضاً بأستعمال أعمدة فحم نشط ولكنها تدمص بعض N'-methylnincotiamide ، ولكن تفضل الراتنجات الأنيونية Dowex 1 - acetate والتى تزيل الأيونات المتداخله بدون فقد فيه ، وأستخدام كلوريد المنجنيز $MnCl_2$ فى الأسيتون ليزيد من فلورة المركب الناتج من التكثيف ، وأقصى طول موجة للاثارة هى٣٥٠ nm . وهذه الطريقة عالية الحساسية وتعطى نفس النتائج عند أعادتها وتستخدم بدرجة كبيرة فى تقدير النياسين فى بول الإنسان .

٦ - تقدير نيكلوتيدات البيريدين Pyridine nucleotides "PN"

أ - فى الدم : - تتفاعل الـ PN مثل النيكويتناميد أحادى النيكلورتيد (NMN)

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مــع جــوهــر الأسيـتون القلوى وتــعطى نـاتج ذو فلورة عــالية . ويستـخـدم هذا التفـاعل فى تقدير مستويات من هذا المعاون الأنزيمى تبلغ ١ ميكروجرام فى عينات الدم الكلى مقدراها ٠,٥ مل أو ٠,٠٢ مل كرات دم حمـراء . وفى هذه الطريقة ، يتم التـخلص من البـروتين فى عينات الدم المعاملة بالأكسالات (oxalated) بواسطة TCA ، ويتم اجراء تفاعل التكثيف فى الراشح الناتج . وبعد ١٠ ق من الترشيح تقراء الفلورة . ويستـعمل NMN كمادة قياسية ، وتحسب النتائج فى صورة NMN قياسية أو NAD لكل مل من الدم أو من الـ RBC .

ب – فى الأنسجة (الطريقة الأسبكتروفوتومترية) : – وفيـها يتم تجنيس الانسجة المجمدة فى مجنس يحتوى على ٢٪ TCA أومــع TCA وفوق أكسيد هيدروجـين H_2O_2 ، وذلك على حسب الرغبة فى تقدير الصورة المؤكسدة أو الصورة المؤكسدة و المختزلة معاً من الـ PN . ويمرر المحلول الرائق والناتج بعد التجنيس على عمود Nuchar C ثم تحل الـ PN بمحلول بيريدين ١٠٪ . وبعد معاملة العينات الناتجة من الأحلال بواسطة $NaHCO_3$ أو $NaHCO_3 + Na_2SO_4$ يتم أكسدتها كلها ويقرأ الامتصاص على طول موجة ٣٤٠ nm فى جهاز الأسبكتروفوتومتر . والفرق بين القراءة بعد الأكسدة أو بعد الاختزال يستخدم كمقياس لـ PNH_2 . ففى خلية القياس ١ سم تحتوى على ١٠٠ µg من PNH_2 / مل تعطى O.D. مقدارها ٠,٨٤٠ ، وعن طريق معرفة حجم المحلول ووزن النسيج يمكن معرفة محتوى الـ PN.

جـ – فى الأنسجة (الطريقة الأنزيمية) : – تحتوى مستخلصات الأنسجة القاعدية والتى يتم معاملتها بعد ذلك على $NADPH.H^+$ و$NADH.H^+$ وعلى كميات صغيرة من NAD^+ , $NADP^+$. وباستـخلاص النسيج فى وسط قاعدى يتم الحصول على الصور المختزلة فقط ، والاستخلاص بالوسط الحامضى يتم الحصول على الصور المؤكسدة فقط . وعليه يمكن قياس الـ NAD^+ الكلى (المؤكسد والمختـزل) و $NADP^+$ الكلى والنسب بين $NADP^+ / NADH.H^+$. وفى هذه الطرق تستخدم كلا الطريقتين الفلوروموترية والأنزيمية .

٧ – **الطرق الحيوية :** – تواجه الطرق الحيوية لتقدير النياسين أو النيكوتنياميد صعوبات عديدة ، وعليه فهذه الطرق غير مرضية للتقدير الكمى . وأهم هذه الصعوبات : –

١ – يتحول التربتوفان إلى نياسين فى الأنسجة .

٢ – يخلق النياسين بواسطة البكتريا المعوية بدرجات متباينة وذلك على حسب تركيب الغذاء المعطى للحيوان .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

هذا ، وتستخدم الكتاكيت والفئران الرضيعة والكلاب الصغيرة puppies لتقدير النياسين ، ولكن فقط تحت ظروف غذائية معينة . وبالطبع يستلزم لها وقت طويل ، كما أنها قليلة الحساسية (لا يعتمد عليها) . وعند تطبيقها فى تقدير محتوى النياسين فى المواد البيولوجية يستخدم عامل الاستجابة المناسب وهو قدرة النياسين على شفاء والوقاية من مرض أسوداد اللسان black tanguc فى الكلاب البالغة . أما الفئران فهى تظهر استجابة كبيرة لتقدير النياسين أو التربتوفان عند تغذيتها على عليقة سكروز وكازين ٩٪ نقى . واستبدال السكروز بالدكستروز أو الجلوكوز فى العليقة يعطى نفس أستجابة النمو عند اضافة النياسين فى العليقة . وعلى ذلك فلابد أن تحتوى العليقة على أقل كمية ممكنة minimal من التربتوفان أو الكربوهيدرات والتى تؤثر على تخليق النياسين . وبالطبع التجارب على الكلاب باهظة التكاليف، هذا بالاضافة إلى عدم تطورها أو تقدمها .

التقدير الحيوى باستخدام الكتاكيت :- عند تغذية الكتاكيت على علائق نقية خالية من النياسين . فإن نموها يبطء وتظهر عليها أعراض نقص نموذجية وهى ألتهاب الحوصله crop والفم والجزء العلوى من المرىء esophagus أما طرف اللسان فيظهر أبيضاضاً . واعطاء النياسين يعالج أعراض النقص فى أيام قليلة ويزيد النمو . وتظهر أعراض النقص على الكتاكيت عمر يوم بعد حوالى أسبوعين من تغذيتها على علائق بنقصها النياسين . وتربى الكتاكيت فى أقفاص كل مجموعة ٦ كتاكيت ويعطى لها الطعام ad libitum، ويقاس نشاط النياسين بنمو الكتاكيت لمدة ٣ - ٤ اسابيع . فى البداية تغذى الكتاكيت على جرعات متدرجة من النياسين على ٥ - ٦ مستويات لتقدير الجرعة اللازمة لزيادة الوزن بصورة خطية مع لوغاريتم الجرعة من النياسين . أخيراً تغذى مجموعتين على جرعة نياسين قياسى ومجموعتين على المادة المختبرة بحيث أحد المجموعتين تأخذ ضعف الكمية التى تأخذها المجموعة الأخرى

تقدير النياسين بالطريقة الرسمية (A.O.A.C. , 1990)

أ - الجوهر الكشافة : -

١ - محاليل النياسين القياسية : -

أ- محلول النياسين القياسى stock standard (١٠٠ ميكروجرام/ مل) : - يحضر بإذابة ٥٠ ملجم نياسين قياسى (سبق تجفيفه وتخزينه فى الظلام وفى مجفف

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحت P_2O_5) فى كحول ٢٥ ٪ ويكمل إلى ٥٠ مل ، ويخزن على حوالى ١٠ ° م .

ب – محلول working st. I (١٠ ميكروجرام / مل) : – يؤخذ جزء من محلول (أ) stock ويترك فترة حتى تصبح درجة حرارته مثل درجة حرارة الغرفة ثم يؤخذ منه ١٠ مل وتخفف إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

حـ – محلول working st. II (٤ ميكروجرام / مل) : – يخفف ٢ مل من المحلول (أ) stock (درجة حرارته مثل درجة حرارة الغرفة) إلى ٥٠ مل بالماء المقطر .

٢ – محلول أيدروكسيد أمونيوم مخفف : – يخفف ٥ مل من محلول NH_4OH إلى ٢٥٠ مل بالماء المقطر .

٣ – محلول حمض هيدروكلوريك مخفف : – يخفف حجم واحد من الحمض المركز مع ٥ حجم ماء .

٤ – محلول فوسفات منظم (p^H = ٨) : – يذاب ٦٠ جم $Na_2HPO_4.7H_2O$ و ١٠ جم KH_2PO_4 فى ماء دافىء وتكمل إلى ٢٠٠ مل بالماء المقطر .

٥ – محلول cyanogen bromide (CNBr) (١٠ ٪) : – يحضر فى خزانة الغازات ، يدفىء ٣٧٠ مل ماء مقطر إلى ٤٠ ° م فى دورق كبير ثم يضاف إليها ٤٠ جم CNBr ويرج المحلول حتى تمام الذوبان ويبرد ثم يخفف إلى ٤٠٠ مل .

تحذير : – يراعى عدم ملامسة المحلول للجلد ، فهو سام جداً . ويخزن فى الثلاجة .

٦ – محلول حمض سلفانيليك Sulfanilic acid ، ١٠ ٪ :– يضاف محلول NH_4OH (مل بعد مل) إلى مخلوط مكون من ٢٠ جم حمض سلفانيليك و ١٧٠ مل ماء مقطر حتى ينوب الحمض ، ثم تضبط درجة الـ p^H إلى ٤,٥ بواسطة محلول HCl (١حمض + ١ ماء) باستعمال دليل bromocresol green (تختبر نقط على شريحة زجاجية) ، ثم يكمل إلى ٢٠٠ مل ، بالماء المقطر ولابد أن يكون المحلول عديم اللون colorless .

٧ – محلول حمض سلفانيليك (٥٥ ٪) : – يضاف ٢٧ مل ماء و ٢٧ مل أيدروكسيد أمونيوم إلى ٥٥ جم حمض سلفانيليك ويرج حتى يذوب (يدفىء المحلول إذا دعت الضرورة) ، ثم تضبط درجة الـ p^H إلى ٧ باستخدام بضع نقط من NH_4OH

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أو HCl (قوته ٥ N) ثم يخفف إلى ١٠٠ مل ، ويحفظ فى الظلام .

ب - تحضير العينة والمحاليل القياسية : -

١ - **المستحضرات الصيدلية** :- يؤخذ عدد مقداره ٥ أو أكثر من الأقراص أو الكبسولات فى حجم قليل من الماء وتشتت فيها مع استعمال الحرارة (وفى حالة الأقراص ، يمكن جرشها أو طحنها قبل هذه العملية) . وبعد ذلك تبرد وتنقل إلى دورق معيارى وتخفف إلى حجم معين بحيث يحتوى على ٥٠ - ٢٠٠ ميكروجرام نياسين لكل مل . يؤخذ ١٠ مل من هذا المحلول فى دورق ٢٥٠ مل ثم يضاف إليها ١٠ مل حمض HCl وتبخر على سخان كهربائى إلى حوالى ٢ مل ثم تبرد ويضاف حوالى ٢٥ - ٥٠ ماء وتضبط درجة الـ p^H إلى ٢,٥ - ٤,٥ بواسطة محلول NaOH أو KOH ٤٠ ٪ و تنقل المحتويات كمياً إلى دورق معيارى مناسب بحيث تعطى تركيز نياسين فى المحلول قدره ٤ ميكروجرام كل مل ، ويكمل إلى حجم معلوم ثم ترشح إذا دعت الضرورة ، ويستبعد أول ١٠ مل من الراشح ويستعمل باقى الراشح فى التقدير .

٢ - **المغذيات** feeds **والأغذية التى لاتحتوى على حبوب** : - توزن وزنة معلومة بالضبط من العينة (حوالى أوقية ounce = حوالى ٣٠ جم) فى دورق مخروطى سعة لتر ، ثم يضاف إليها ٢٠٠ مل محلول حمض كبريتيك مخفف (قوته ١ N) وتخلط المحتويات وتسخن لمدة ٣٠ ق فى الأتوكلاف على ضغط قدره ١٥ رطل . تبرد المحتويات وتضبط درجة الـ p^H إلى ٤,٥ بواسطة محلول NaOH (١٠ ٪) باستعمال دليل bromocresol green كدليل خارجى (تختبر درجة الـ p^H خارج المخلوط بأخذ نقط منه مع الدليل على شريحة زجاجية) ، ثم تخفف إلى ٢٥٠ مل بالماء وترشح . يوزن١٧ جم كبريتات أمونيوم فى دورق معيارى ٥٠ مل ويوضع فيها ٤٠ مل من محلول العينة وتخفف بالماء إلى العلامه وترج جيداً . يرشح المحلول ويؤخذ منه مل واحد لاظهار اللون (التقدير) . وفى حالة العينات التى تحتوى على ١٦ ملجم نياسين / رطل ، يستعمل المحلول النهائى بحيث يحتوى المل الواحد منه على حوالى ٣,٢ ميكروجرام نياسين .

وبالمثل يؤخذ ٤٠ مل من المحلول القياسى working st. II ، وتضاف إلى دورق معيارى ٥٠ مل يحتوى على ١٧ جم كبريتات أمونيوم وتخفف إلى العلامة بالماء ، فهذا المحلول القياسى يحتوى على ٣,٢ ميكروجرام / مل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣ - **منتجات الحبوب** Cereal products :- إلى ٦ دوارق مخروطية سعة ٢٥٠ مل يضاف لكل منها ١,٥ جم أيدروكسيد كالسيوم $Ca(OH)_2$ ثم يضاف إليها صفر و ٥ و ١٠ و ١٥ و ٢٠ و ٢٥ مل من المحلول القياسى woking st. I ، على التولى . يوزن بالضبط حوالى ٢,٥ جم من العينة بحيث تحتوى على حوالى ١٠٠ ميكروجرام نياسين وتوضع فى دورق آخر (الدورق رقم ٧) يحتوى أيضاً على ١,٥ جم أيدروكسيد كالسيوم . إلى كل الدوراق يضاف ماء إلى حوالى ٩٠ مل ثم ترج لتمام الخلط وتسخن فى الأتوكلاف لمده ساعتين على ١٥ رطل . ترج المخاليط وهى ساخنة باستمرار حتى تبرد إلى درجة حراره حوالى ٤٠ ° م ، وتنقل إلى دوراق معيارية ١٠٠ مل ، ثم تخفف إلى ١٠٠ مل (إذا لزم الأمر ، يمكن تخزين العينة فى الثلاجة أيام قليلة) .

ينقل حوالى ٥٠ مل من المحلول الرائق من كل دورق إلى أنابيب طرد مركزى وتوضع فى حمام ثلجى لمدة ١٥ ق أو فى الثلاجة لمدة ساعتين أو أكثر . يتم الطرد المركزى لمده ١٥ ق ثم يؤخذ ٢٠ مل من المحلول الرائق من كل أنبوبة وتنقل إلى أنابيب طرد مركزى أخرى تحتوى على ٨ جم من كبريتات الأمونيوم و ٢ مل محلول فوسفات منظم . ترج الأنابيب لذوبان محتوياتها وتدفء إلى ٥٥ - ٦٠° م . تطرد الأنابيب مركزياً ثم ترشح خلال ورق ترشيح واتمان رقم ١٢ أو إى نوع آخر من ورق الترشيح يماثله . يعاد الترشيح إذا دعى الأمر حتى نحصل على محلول رائق ، ثم يؤخذ للتقدير .

حـ - التقدير : -

١ - بالنسبة للمستحضرات الصيدلية والمغذيات والأغذية التى لاتحتوى على حبوب : -

إلى ٤ انابيب تضاف الكميات التالية (بالمل) مع مرعاه اضافة محلول حمض السلفانيليك ومحلول CNBr بواسطة سحاحات أو ماصات خاصة متصلة بشفط ميكانيكى (لأن هذه المحاليل سامة)، و فى خزانه الغازات ، ويستعمل المحلول القياسى working st .II

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Solution	Standard blank	Sample blank
1 - St. solution or sample	1.0 (st.)	1.0 (sample)
2- H_2O	5.0	5.0
3 -dil.NH_4OH	0.5	0.5
4 - 10% sulfanilic acid	2.0	2.0
5 - dil. HCl	0.5	0.5

Solution	St. solution	Sample solution
1 - St. or sample sol.	1.0 (st.)	1.0 (sample)
2- dil . NH_4OH	0.5	0.5
3 -CNBr	5.0	5.0
4 - 10% sulfanilic acid	2.0	2.0
5 - H_2O	0.5	0.5

تحضير البلانك : – عند تحضير البلانك ، يراعى تحضير بلانك لكل عينة على حده (في حالة وجود أكثر من عينة) ، ويوضع ١,٠ مل من المحلول القياسي في أنبوبة مناسبة و ١,٠ مل من المحلول القياسي في أنبوبة أخرى ثم يضاف ٥,٠ مل ماء إلى كل منها . ويراعى إضافة كل المحاليل بالتتابع السابق ذكره في الجدول في كل أنبوبة ، ويقاس اللون قبل إجراء نفس العملية على الأنبوبة الأخرى. يقلب الـ st.blank بحركة رحوية دائرية swirl حتى نحصل على حركة دائرية في المحاليل داخل الأنابيب ، وبسرعة وفي الحال تضاف كبريتات الأمونيوم المخففة وتحرك الأنابيب رحوياً مرة أخرى، ثم يضاف حمض السلفانيليك وتحرك مرة ثالثة . أخيراً و بسرعة يضاف حمض HCl المخفف (٠,٥ مل) ويخلط المحلول ثم يوضع في جهاز قياس الألوان photoelectric colorimeter ، ويضبط الجهاز على امتصاص صفر (0A) على أي طول موجة متخصصة بين ٤٣٠ و ٤٥٠ nm خلال ٣٠ ثانية بعد اضافة محلول حمض السلفانيليك .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

تحضير المحلول القياسى : -

يعامل المحلول القياسى بنفس الطريقة التى عومل بها الـ st. blank ويضاف محلول كبريتات الأمونيوم المخففة إلى المحلول القياسى ، وتحرك الأنبوبة رحوياً بمجرد اضافتها ، ثم يضاف محلول CNBr وتحرك مرة ثانية ، وبعد ٣٠ ثانية من اضافة الـ CNBr يضاف محلول حمض السلفانيليك وتحرك رحوياً مرة ثالثة ، وفى الحال وبسرعة يضاف الماء وتخلط جيداً وتغلق الأنبوبة . وبواسطة الجهاز الذى سبق ضبطه على 0A بواسطة st. blank كما سبق ذكره ، يقاس الأمتصاص A للمحلول القياسى عندما يبلغ اللون أقصاه (يبلغ اللون أقصى درجة بعد ١,٥ ق بعد إضافة الحمض ، ثم يقل ببطء) .

تحضير محلول العينة : -

يحضر بنفس الطريقة كما فى تحضير المحلول القياسى ولكن يقاس أمتصاص العينة A ضد الـ sample blank . محتوى النياسين يتناسب مع A لو كان المحلول القياسى ومحلول العينة لهما تقريباً نفس التركيز .

٢ - بالنسبة لمنتجات الحبوب : -

إلى أنبوبتى اختبار ، يضاف ٥ مل من المحلول القياسى وإلى أنبوتين آخرتين يضاف ٥ مل من محلول العينة ، وإلى أنبوبة خامسة اضافية يضاف ٥ مل ماء (تعتبر reagent blank) . إلى أحدى أنبوبتى المحلول القياسى ومحلول العينة (يستعملا كبلانك) يضاف ١٠ مل ماء إلى كل منها . تترك الأنابيب تبرد فى حمام ثلجى مجروش جيداً لمدة ٣٠ ق (يفضل ذلك عن الثلاجة) . وإلى الأنبوبتين الباقيتين وأنبوبة الـ reagent blank يضاف ١٠ مل محلول CNBr بارد ، ثم بعد ٣٠ ثانية يضاف ١,٠ مل محلول حمض السلفانيليك ٥٥٪ ، ثم تخلط بسرعة بعد اضافة كل جوهر (يتم تحريك الأنابيب رحوياً بعد بكل اضافة) ، ثم تغلق الأنابيب التى تحتوى على جوهر CNBr وتوضع فى الحمام الثلجى . يضاف إلى كل من بلانك العينة والبلانك القياسى st. blank مل واحد من محلول حمض السلفانيليك ٥٥ ٪ .

يضبط جهاز قياسى الألوان على الصفر 0A وعلى طول موجة ٤٧٠ nm بواسطة بلانك القياسى ، ويقاس أمتصاص الأنابيب مرة الأخرى بعد ١٢ - ١٥ ق من اضافة حمض السلفانيليك . هذا ، ولابد أن تكون الأنابيب متماثلة فى البرودة ولابد أن تكون كل أنبوبة جافة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وتم مسحها جيداً قبل أن توضع فى الجهاز مباشرة ، ولو كانت الأنابيب مضببه fog (عليها ضباب ، بخار ماء متكثف) ، فأنها تغمر لبرهة بسيطة فى حمام مائى ساخن ثم تجفف وتمسح جيداً قبل قراءتها . تصحح قيم A الخاصة بقراءات المحاليل القياسية مع الـ reagent blank ثم يرسم المنحنى القياسى للعلاقة بين قيم A وكمية النياسين (ميكروجرام / مل) فى صورة خط مستقيم ومنه يحسب تركيز النياسين فى العينة (C) بعد تصحيح قيمة A لمحلول العينة من الـ sample blank ومن الـ reagent blank . وتحسب كمية النياسين بالمجم لكل ١٠٠ جم عينة من المعادلة التالية :-

$$\text{mg Niacin / 100 g sample} = \frac{(C)}{10 \times \text{g sample}}$$

تقدير النيكوتيناميد فى المستحضرات عديدة الفيتامينات

(A.O.A.C, 1990) (Multivitamins)

وفى هذه الطريقة ، يتم استخلاص النيكوتيناميد بواسطة محلول KH_2PO_4 على درجة p^H حوالى ٤,٥ ثم يسمح بتفاعله مع جوهر CNBr و barbituric acid فيتكون مركب ملون (أقصى أمتصاص له على طول موجة ٥٥٠ nm) يقاس بواسطة جهاز قياس الألوان . ولايتداخل النياسين إلا لو كان تركيزه ٣ أمثال تركيز الأميد .

الجوهر الكشافة : -

١ – محلول CNBr (١٠ ٪) : – ويحضر كما سبق تحضيره فى الطريقة السابقة ، ويترك على درجة حرارة الغرفة لفترة قبل استعماله حتى يأخذ نفس درجة الحرارة.

٢ – محاليل الفوسفات المنظمة (kH_2PO_4) : -

محلول أ (٣ ٪) : – ويحضر بإذابة ٣,٠ جم KH_2PO_4 فى لتر ماء مقطر .

محلول ب (٠,٣٪) : – ويحضر بتخفيف حجم واحد من المحلول (أ) مع ٩ حجوم ماء مقطر .

٣ – محلول barbituric acid المنظم :– ويحضر الحجم اللازم منه للتحليل كما يلى : يضاف ٢ جم barbituric acid (AR) إلى ١٠٠ مل محلول فوسفات منظم (٣٪)، ثم يقلب لمدة ساعة (ميكانيكياً) ، ويرشح قبل الاستعمال .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤ – محاليل النيكوتيناميد القياسية : –

أ – المحلول الـ stock (٢٥٠ مـيكروجـرام / مل) :– يذاب ٥٠ ملجم من USP Nicotinamide ref. st. في كـحـول ٦٠٪ ثم تخـفف إلى ٢٠٠ مل . يخـزن على حوالى ١٠ ° م .

ب – المحلول الـ woking (٥ مـيكروجـرام / مل) :– يتـرك جزء من المحلول (أ) ليدفء ويأخذ درجة حرارة الغرفة ثم يخفف ٢ مل منه إلى ١٠ مل بواسطة المحلول المنظم (٠,٣٪) .

تحضير العينات : –

يؤخذ ٥ أقراص أو كبسولات أو حجم مناسب من المستحضرات السائلة لكل تقدير . تطحن جيداً حتى تصبح مسحوقاً ناعماً ثم يؤخذ منها وزن معلوم بالضبط ويوضع في دورق مـخروطى (بالنسـبة للكبسـولات الجيـلاتينيـة ، يضـاف حـوالى ٢ مل ethylene chloride للمسـاعدة على التفتيت) . يضـاف حجم من مـحلول الفوسـفات المنظم ٠,٣٪ (بالمل) يعادل على الأقل مـرتين لكل ملجرام نيكوتيناميـد متوقع في الوزنة المأخوذة . وفي حالة عدم ذوبان العينة بسـهولة ، يرج المحلول لكى تتـفـتت وتسـخـن لمدة ١٥ ق في حـمـام مـائى يغلى أو في أتوكلاف على ضـغط ١٥ رطل ، ثم تخـفف إلى حوالى ٥ مـيكروجـرام / مل بواسطة مـحلول الفوسفات المنظم (٠,٣) ، ويرشح إذا دعى الأمر .

التقدير : –

يحضر بلانك لكل عينة على حده باستبدال الـ CNBr بالماء .

١ – يوضـع ١,٠ مل من المحلول القـيـاسـى الـ working ، أو من مـحلول العـينة في أنبـوبة اخـتـبار أوخليـة قيـاس ، ثم ٠,٥ مل مـحلول CNBr وتخلط جـيـداً وتغطى وتترك لمدة ٢٥ – ٣٠ ق (وحـتى نتجنب الانتظار أكثر من ٣٠ ق في حـالة تحليل عدة عينات ، يتم تنظيم اضافة الـ CNBr بحيث يضـاف بفرق زمنى مقداره ١ – ٢ ق بين كل تقدير) .

٢ – يضــاف ١٠ مل مـحلول barbituric acid ثم تحـرك الأنبـوبة رحـوياً (في حـالة صـعـوبة اضـافـة هذا المحلول بعـد ٣٠ ق ، تنقل الأنابيب إلى حمـام ثلج مـجروش

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

لتثبيت تفاعل الـ CNBr).

٣ - يضبط جهاز الأسبكتروفورمتر على صفر أمتصاص 0A وعلى طول موجة مقداره ٥٥٠ nm ضد بلانك مناسب والذى يستبدل فيه الـ CNBr بالماء ، ويقاس الأمتصاص A الخاص بنواتج التفاعل عند أقصى ظهور للون (حوالى ٢ - ٤ ق بعد أضافة محلول الـ barbituric acid ، ثم يبقى اللون ثابتاً لمده دقيقة وبعد ذلك يقل ببطء) .

الحساب : -

يحسب تركيز النيكوتيناميد بالملجم فى الوزنة الأصلية المأخوذة من العينة بواسطة هذه المعادلة : -

$$\text{mg Nicotinamide in original wt . sample taken} = \frac{A \times 5 \times \text{dilution factor}}{\acute{A} \times 1000}$$

حيث أن : -

A = هى أمتصاص العينة .

Á = هى أمتصاص المحلول القياسى .

5 = هى عدد ميكروجرامات النيكوتيناميد لكل مل واحد من المحلول القياسى .

هذا ، ويمكن نسبة تركيز النيكوتيناميد إلى عدد الأقراص أو الكسبولات أو لحجم معين من المستحضر السائل .

تقدير 1 - methylnicotinamide فى البول

(Huff and Perlzweig , 1947)

يتم أدمصاص الـ 1-methylnicotinamide على عمود يحتوى على زيوليت مخلق Synthetic zeolite على درجة P^H ٤,٥ ، ثم يحل بواسطه كلوريد بوتاسيوم ، ويتحول هذا المركب إلى مركب آخر له خاصية الفلورة عند معاملته بالقلوى . يتم أستخلاص المركب المفلور بواسطة بيوتانول ثم تقاس الفلورة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجواهر الكشافة :-

الجواهر من رقم ١ إلى ٥ فى هذا التقدير هى نفس الجواهر الخاصة بتقدير الفيتامين فى الطريقة السابقة والتى لها التتابع التالى : - ١ ، ٢ ، ٣ ، ٥ ، ٦ .

٦ - محلول stock standard 1-methylnicotinamide chloride (١٠٠ ملجم / لتر فى ماء) .

٧ - محلول working standard (٥ ملجم / لتر) : - يخفف ٥ مل من المحلول رقم (٦) إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر ويضاف إليها ٤٠٠ ملجم حمض أكساليك .

التكنيك : -

١ - تجمع عينة البول كما ذكر فى تقدير الثيامين ، وتنفذ نفس الخطوات حتى أول تخلص من المحلول الرائق .

٢ - تغسل مرة إضافية فقط باستعمال ٨ مل حمض خليك ثم يزال المحلول الرائق ويهمل .

٣ - يضاف ٥٠٠ µl محلول كلوريد بوتاسيوم ثم يرج جيداً . وبعد ذلك يضاف إليها ٢,٠ مل بيوتانول و ٢٥٠ µl محلول هيدروكسيد صوديوم ، وتغلق الأنبوبة جيداً وترج وتقلب الأنبوبة حوالى ٢٥ مرة لمدة أكثر من دقيقة .

٤ - يجرى طرد مركزى على حوالى ٣٠٠٠ rpm لمدة ١٠ ق ، ثم ينقل ١,٠ مل من الطبقة العليا (طبقة البيوتانول) إلى أنبوبة قياس الفلورة لاجراء القياس .

٥ - تسجل القراءات الفلوروميترية على طول موجة أنبعاث مقدارها ٤٦٠ nm ، وعلى موجة اثارة يبلغ ٣٦٠ nm (ليس قبل ٥ ق من بعد اضافة القلوى).

٦ - يتم ضبط حساسية الجهاز على الصفر بواسطة مستخلص بلانك blank extract.

الحساب : -

يحسب التركيز من المعادلة التالية : -

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

$$\text{Urinary 1-methylnicotinamide (mg / l)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times \frac{10}{V}$$

حيث أن : -

V هى حجم البول بالمل المأخوذ للتحليل .

التفسير : -

متوسط المفرز يومياً من 1-methylnicotinamide (عند تناول حـمض النيكوتينيك بحد كافى) هو حوالى ٧ ملجم ، و مدى المفرز منه هو ٣ - ١٧ ملجم .(الحدود الطبيعية) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

البيوتين – Biotin

O
HN NH
S $(CH_2)_4$ COOH

تفاعلاته :

البيوتين ثابت للحرارة والضوء فقط ، ولكنه غير ثابت فى الوسط القلوى والحامضى وللعوامل المؤكسدة . وبالاختزال يكون desthiobiotin . والبيوتين حامضى التأثير عند ذوبانه فى الماء .

الذوبان :

يذوب فى الماء بنسبة ٠,٠٣ جم / ١٠٠ مل ، ويذوب أيضاً فى الكحول ، ولكنه غير ذائب فى الأسيتون والمذيبات الغير قطبية (بنزين ، كلوروفورم ، ايثير) .

صوره وخواصه :

صورته النقية عبارة عن مسحوق أبيض ، أما الصورة البللورية الألفا (α) فهى ذات شكل معينى orthorhombic والصورة البيتا (β) فهى عديمة اللون . والوزن الجزيئى للبيوتين هو ٢٤٤,٣ ، ودرجة الانصهار ٢٣٠,٣٢ ° م . و يوجد فى صورة ملح صوديوم ، و أقصى أمتصاص له على طول موجة ٢٣٤ nm . وطبيعته الكيميائية حمض أحادى القاعدية ، ثنائى الأمين diamino , monocarbxylic acid . وعلى ذلك فله نقطة تعادل كهربى P^i = ٣,٥ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أنتشاره ومصادره :

١ - **فى النباتات** :- تحتوى كل الفواكه والخضروات على كميات قليلة منه عدا البقول والقرنبيط ، أما الحبوب والنقل فهى تحتوى على كميات متوسطة منه .

٢ - **فى الحيوانات** :- تحتوى الحيوانات على كميات بسيطة منه عدا الأعضاء خاصة الكبد ، أما الكلى فهى تحتوى على كميات عالية منه .

٣ - **الكائنات الحية الدقيقة** :- أحسن مصدر للبيوتين هو الكائنات الحية الدقيقة خصوصاً الخميرة .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** :- (١٠٠ - ٤٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل الغذاء الملكى للنحل royal jelly ، والخميرة وكبد الضأن و الخنزير .

٢ - **المصادر المتوسطة** :-(١٠ - ١٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل القمح والأرز و الذرة و الشوفان والشعير و البيض و كبد البقر و الدجاج و عيش الغراب (المشروم) والحمض وفول الصويا والقرنبيط والشيكولاته و الماكريل والسالمون والسردين والبكان والفول السودانى .

٣ - **المصادر المنخفضة** :-(صفر - ١٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل التفاح والموز والفرولة والكانتالوب والجريب فروت و العنب و البرتقال والخوخ و الأفوكادو والبطيخ .

الدور الطبى والعلاجى :

١ - **الوحدات** :- بالوزن (ميكروجرام µg).

٢ - **المستويات الطبيعية فى الدم** :- فى الإنسان يبلغ مستواه ٠,٩٥ - ١,٦ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل سيرم ، و٠,٧٥ - ١,٧٣ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل دم كلى .

٣ - **المقررات الموصى بها** :- للبالغين يوصى بـ١٥٠ - ٣٠٠ ميكروجرام / يوم، وربما تتاح هذه الكمية من البكتريا المعوية والغذاء اليومى الطبيعى .

٤ - **أعطاء البيوتين** :- الطريقة الأساسية لتناوله هى عن طريق الفم ، ويمكن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

اعطاءه بالحقن فى العضل .

٥ - أعراض النقص : -

أ - أعراض عامة فى الإنسان : - تقشر desquamation الجلد ، و ألم فى العضلات ، و فرط الحساسية hyperesthesia و التهاب جلدى مصحوب بزيادة أفراز الغدد الدهنيه ، ونعاس somnolence وكسل وتعب من أقل مجهود .

ب - فى الفئران :- سقوط الشعر alopecia ، و قوف الحيوان مثل الكانجرو ... الخ .

جـ - فى الدجاج والرومى : - ألتهاب جلدى ، و perosis .

د - فى الكلاب : - نقص أيون البوتاسيوم ، وعجز أوشلل متقدم .

هـ - فى الخنازير : - سقوط الشعر و تشنج الأرجل الخلفية .

و - فى القرود : - حل الشعر thinning ، وضياع لونه .

٦ - أمراض نقصه فى الإنسان : - التهاب جلدى وزياده افراز الغدد الدهنية مع ألتهاب جلدى فى الأطفال . ظهور خراريج ودمامل furunclosis .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه : - كل الأجناس تحتاجه .

أ - المصادر الخارجية : - معظم الفقاريات والافقاريات تحتاجه من مصادر خارجية . أيضاً بعض البكتريا والفطريات لا يمكنها تخليقه وتحتاجه من المصادر الخارجية . هذا ، و البكتريا المعوية تمد الإنسان بما يحتاجة من البيوتين .

ب - المصادر الداخلية : - النباتات الراقية ومعظم البكتريا والفطريات تخلقه ، ولذلك فهى لا تحتاجه من الخارج .

٨ - تأثير الجرعات العالية منه : - لم تلاحظ إى أعراض سمية عند أعطاءه بكمية مقدارها جم واحد لكل كجم من وزن الجسم ، وهو غير سام للإنسان بكميات كبيرة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحليل البيوتين

أ - الفصل :

استخدمت مصادر طبيعية مختلفة لفصل البيوتين فى صورة أستر الميثايل ، ومن هذه المصادر صفار البيض وكبد البقر واللبن . ويفصل من صفار البيض عن طريق الأستخلاص بالأسيتون ثم ترسيبه بالأيثانول . ويتم التخلص من المواد المتداخله (الشوائب) بالترسيب على مراحل بأستعمال خلات الرصاص أو كلوريد الزئبقيك أو حمض الفوسفوتنجستيك ثم ينقى المستحضر بادمصاصه على فحم نشط ، ثم يحل منه ويؤستر باستعمال كلوريد هيدروجين ميثانولى فيترسب و يقطر تحت تفريغ . وتعاد بللورته باستعمال مخلوط من الكلوروفورم والايثير البترولى . والناتج له درجة انصهار ١٤٦ - ١٤٧° م .وعند فصله من الكبد ، يتم تعقيمها مع الحمض فى الاتوكلاف ، ثم تهضم بالببابين papain ، أو تحلل مائياً تحت ضغط عالى قبل البدأ فى فصل البيوتين ، ثم يفصل كما سبق (الترسيب بحمض الفوسفوتنجستيك ثم أسترته) . ويمكن أيضاً فصله من اللبن المركز بنفس هذه الطريقة . وبعد الفصل يتم التأكد من نقاوته بالتحليل الكروماتوجرافى على أكسيد الومنيوم نشط .

ب - طرق التحليل :

١ - **الطرق الميكروبية** :- كثير من الكائنات الحية الدقيقة تحتاج إلى البيوتين كعامل نمو ، وعلى ذلك فإن عديد من هذه الكائنات تستخدم فى تقدير البيوتين ، ومنها L. casei على سبيل المثال . ومن هذه الميكروبات مايستجيب لمشابهات البيوتين كمنشطات مشجعة للنمو والبعض لا يستجيب لها . والكائنات الحية الدقيقة لا تستجيب للبيوتين المرتبط بالبروتين ، لذلك يجب تحريره منها بمعاملة المادة تحت الدراسة بحمض كبريتيك (تحليل مائى) أو الهضم بالببابين . وتتداخل الأحماض الدهنية الغير مشبعة فى التقدير لذلك يجب التخلص منها إما بالترشيح أو عن طريق الاستخلاص بالايثير . ويقدر محتوى البيوتين للعينات المختبرة بقياس نمو الكائن الحى الدقيق (عامل الاستجابة) بعد تحضينه . ويقدر النمو بقياس العكارة ، وتقارن بنموات قياسية مع تركيزات معلومة من البيوتين .

٢ - **طريقة التآلف مع الأفيدين** :- استخدم التآلف العالى للأفيدين avidin (مشع) لمجموعة الـ ureido فى البيوتين فى التقدير . وهذا التقدير حساس جداً حتى مع التركيزات الصغيرة (٤ - ٤١ بيكومول) ، وأعطت نتائج جيدة ودقيقة عند مقارنتها بالطرق

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الميكروبية . وفى هذه الطريقة يتم تحليل البيوتين المرتبط بالحمض أو هضمه بالببابين . ويستخدم قياس الإشعاع لتقدير محتوى البيوتين لبروتينات البيوتين أو لتقدير مشابهات البيوتين . وأمكن حديثاً تعديل هذه الطريقة (قياس ارتباط البيوتين بالأفيدين) وفيها يتم ارتباط البيوتين باليود ١٢٥ (مشع) مع الأفيدين . وهذه الطريقة أكثر حساسية وأستخدمت بنجاح فى تقدير البيوتين فى بلازما الإنسان وغيرها من العينات . .

٣- الطرق الأنزيمية :- نشاط الأنزيمات التى تعتمد على البيوتين يقل فى الحيوانات التى تعانى من نقص البيوتين ، واستخدم هذا الأساس فى تقدير البيوتين (قياس النشاط الأنزيمى) . ومن هذه الأنزيمات acetyl CoA carboxylase (يدخل فى تركيبه البيوتين) فنشاطه يرتبط بحالة البيوتين فى الجسم . ويستخدم اختبار تنشيط أنزيم acetyl CoA carboxylase فى تقدير حالة البيوتين فى الجسم وذلك عن طريق حث نشاط هذا الأنزيم فى كبد الكتاكيت بالبيوتين (<u>in vitro</u>) . أما تقدير نشاطه فى الدم ، فلا يعطى نتائج ثابتة يعتمد عليها . أنزيم آخر يحتوى على البيوتين وهو pyruvate carboxylase (PC)، ويوجد أيضاً فى دم الدجاج المنزلى ، وهو دليل أكثر حساسية لحالة البيوتين فى الجسم عن أنزيم acetyl CoA carbaxylase . ويستخدم قياس نشاط أنزيم PC الدم مباشرة لتقدير حالة البيوتين فى جسم الدجاج والرومى ، أو يقدر نشاطه فى الدم أيضاً ولكن قبل وبعد اضافة البيوتين (<u>in vitro</u>) إلى كرات الدم الحمراء أو إلى الكبد .

٤ - الطرق اللونية :- وتوجد طرق لونية عديدة منها :-

١ - طرق تعتمد على تفاعل البيوتين مع p-(dimethylamine) cinnamaldehyde .

٢ - طرق تعتمد على قياس امتصاص اليود المتكون أثناء أكسدة البيوتين إلى الصورة sulfone بيوديد البوتاسيوم .

٣ - طرق تعتمد على إزاحة صبغة 4 - hydroxyazobenzene -2- carboxylic acid من الأفيدين بالبيوتين .

٥- طرق أخرى :- استخدمت الطرق الكروماتوجرافية والبولاروجرافية polargraphy فى تقديره أيضاً .

٦ - الطرق الحيوية :- تستخدم الفئران والكتاكيت فى التقدير الحيوى للبيوتين

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

بتغذيتها على عليقة خاصة . وفيها يتم تغذية فئران رضيعة فى نفس العمر والوزن (٣٥ – ٤٠ جم) على عليقة مصنعة تجريبية تحتوى على بياض بيض نيىء raw (طازج أو مجفف) أو على أفيدين . واحتواء العليقة على الأفيدين يمنع استفادة الحيوانات من البيوتين بتكوين معقد غير قابل للامتصاص unabsorabable مع الفيتامين ، وبعد فترة استنزاف الفيتامين وهى حوالى ٦ – ٧ أسابيع تلاحظ على الفئران أعراض نقص البيوتين وتوقف النمو . وتعطى المجموعة القياسية كميات متدرجة من البيوتين النقى ، وتعطى المجموعة الأخرى كميات متدرجة أيضاً من بيوتين العينة المختبرة . وحيث أن الطعام يحتوى على أفيدين ، فإن البيوتين المعطى (القياسى أو العينة) يعطى عن طريق آخر غير معوى (غير الفم) حتى تتيسر الأستفادة منه . ويمكن معرفة محتوى البيوتين فى العينة من منحنيات استجابة النمو ، حيث يتناسب وزن الجسم المكتسب مع لوغاريتم جرعة البيوتين .

ويستخدم نفس التكنيك فى الكتاكيت ، ولكنها تحتاج إلى جرعات بيوتين أكبر من الفئران . ويمكن أحداث حالة النقص فى الكتاكيت بتغذيتها على علائق منخفضة فى البيوتين بدون أضافة أفيدين إليها . وفى هذه الحالة (عدم اعطاء افيدين) يمكن أعطاء جرعات البيوتين القياسية والخاصة بالعينة عن طريق الفم مع العليقة .

تقدير البيوتين بالطريقة الفلورومترية (Lin and Kirsch , 1977)

كما هو معروف إن هناك تآلف قوى بين البيوتين والأفيدين . وقد أستخدمت هذه الخاصية لتقدير البيوتين أو الأفيدين أو كلاهما معاً . فالأفيدين له خاصية الفلورة والتى ترجع الى وجود التربتوفان ولكن عند أرتباطه بالبيوتين تقل هـذه الفلـورة بنسبة أرتباطهما معاً (علاقة عكسية بين فلورة الأفيدين وكمية البيوتين المرتبطة معه) . ويشترط أن تكون هذه المحاليل خالية من المواد المفلورة خلاف الأفيدين ، لذلك فهذه الطريقة مناسبة للمواد النقية نسبياً . ويقدر الأفيدين كمياً بمعايرة محلوله بواسطة محلول بيوتين قياسى مع قياس الفلورة (طول موجة الاثارة ٢٩٠ nm وطول موجة الأنبعاث ٣٥٠ nm) . أثناء المعايرة يلاحظ انخفاض الفلورة باستمرار المعايرة ، وتتوقف المعايرة عندما لايكون هناك إى أنخفاض اضافى فى الفلورة نتيجة أضافة إى كمية زيادة من البيوتين . أما فى حالة تقدير البيوتين ، يتم معايرة محلول البيوتين المجهولة التركيز بمحلول قياسى من الأفيدين . والفلورة تحت هذه الظروف تكون ثابتة طالما أنه يوجد بيوتين فى وعاء المعايرة ولكن عندما يقضى عليه نهائياً

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

يلاحظ زيادة الفلورة مع كل أضافة جديدة من محلول الأفيدين (زيادة طردية) . وتتوقف المعايرة عند أول نقطة تزيد عندها الفلورة . ومن مميزات هذه الطريقة هو أمكان تقدير ٢٠ نانوجرام ng من البيوتين .

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول أفيدين قياسى (٢٥٠ ميكروجرام / مل) .

٢ - محلول بيوتين قياسى (٢٠ ميكروجرام / مل) .

وكلا الجوهرين يحضرا فى محلول فوسفات صوديوم (٠,١٥ N ، p^H = ٧) ، وقوة آيونية ionic strength = ٠,٢٥ .

التكنيك : -

أ - تعيير محلول الأفيدين : -

١ - فى أنبوبة قياس الفلورة تسع ٤ مل ، يوضع ٢ مل من محلول البيوتين القياسى، وتوضع فى الجهاز استعداداً لمعايرتها بمحلول الأفيدين .

٢ - يضاف إليها محلول الأفيدين القياسى (بواسطة سحاحة دقيقة syring micro buret) على دفعات ، فى كل دفعة يضاف ٢,٠ µl وتسجل الفلورة بعد كل اضافة (excitation monochromator على طول موجة ٢٩٠ nm باستعمال band width مقداره ٤ nm ، وتؤخذ قراءات الفلورة على طول موجة ٣٥٠ nm ، بأستعمال band width مقداره ١٦ nm) .

٣ - تستمر عملية المعايرة حتى تعطى قراءة ثابتة (دلالة على أنتهاء مكافئات البيوتين)، ثم يعرف حجم البيوتين المستخدم للمعايرة .

٤ - من هذه النتائج يمكن تعيير الأفيدين (حجم أو وزن الأفيدين اللازم للارتباط مع كمية معية من البيوتين) .

ب - معايرة بيوتين العينة : -

١ - كما سبق تعيير الأفيدين بالبيوتين ، تتم معايرة ٢,٠ مل من محلول البيوتين المجهول التركيز (العينة) بواسطة محلول الأفيدين القياسى على دفعات ، مقدار

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

كل منها ٢,٠ μ l وتسجل القراءة عند كل إضافة .

٢ - تستمر عملية المعايرة حتى النقطة التى تبدأ عندها الفلورة فى الزياده الحـــادة (تدل على نقطة المكافىء) .

٣ - تحسب كمية البيوتين من النشاط النوعى specific activity لمحلول الأفيدين الذى سبق تعيينه (تعييره) فى الخطوه أ .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Pantotheric acid – حمض البانتوثينيك

$$HO-CH_2-C(CH_3)_2-CH(OH)-CO-NH-CH_2-CH_2-COOH$$

Pantoic acid   β– Alanine

تفاعلاته :

هذه الفيتامين ثابت فقط ضد العوامل المؤكسدة والعوامل المختزلة ، ولكنه غير ثابت للحرارة وللأحماض وللقواعد (الساخنة) . عند ذوبانه فى الماء يكون تأثيره حمضى ، ويوجد أساساً فى صورة أملاح ، خصوصاً ملح الكالسيوم ، وأحياناً ملح الصوديوم . و يعتبر هذا الفيتامين حمضاً عضوياً عديد الهيدكسيل ، وحمضاً أمينياً مرتبطاً أيضاً .

الذوبان :

يذوب فى الماء بنسبة عالية (٧ جم / ١٠٠ مل ماء) ، ويذوب أيضاً فى الأسيتون والكحول ، ولكنه غير ذائب فى المذيبات الغير قطبية (بنزين ، كلوروفورم ، إيثير) .

صوره وخواصه :

صورته النقية زيتية لزجة القوام ، ذات لون أصفر ، الوزن الجزيئى له ٢١٩,٢٤، وأقصى امتصاص له على طول موجة ٣٥٨ nm .

انتشاره ومصادره :

١ – **فى النباتات** :- تركيزه فى كل الفواكه منخفضاً ، وفى الخضروات منخفضاً أيضاً أو متوسط التركيز ، أما فى النقل فتركيزه يختلف من نوع لآخر .

٢ – **فى الحيوانات** : – ينتشر فى كل الحيوانات بصورة متوسطة أومرتفعة، وأهم

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الأعضاء التى تحتوى على تركيز عالى منه هى : المخ والقلب والكلى والكبد .

٣ - **فى الكائنات الحية الدقيقة** :- ينتشر بكثرة فى الخميرة (عالى) ، وفى بكتريا الكرش فى الغنم والبقر ، وفى الفطريات أيضاً .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** : - (من ٢ إلى ١٠ ملجم / ١٠٠ جم) وتضم البقر (مخ وقلب وكبد وكلى) ، وفى الخنزير (كبد وكلى) ، وفى كبد الضأن والدجاج وكلى الحملان وفى البيض، وفى الرنجة ومبيض الحوت cod ovary ، وفى جنين القمح والفول السودانى والحمض الجاف والخميرة والغذاء الملكى وأخيراً فى النخالة .

٢ - **المصادر المتوسطة** :-(من ٠,٥ إلى ٢ ملجم / ١٠٠ جم) كما فى السالمون والماكريل وفول الصويا والشوفان والحمص و القرنبيط و الأفوكادو والجزر و الأرز والسبانخ وفى لحم كل من البقر والخنزير والدجاج والحملان ، وفى المشروم (عش الغراب) والقمح والجبن .

٣ - **المصادر المنخفضة** :-(من ٠,١ إلى ٠,٥ ملجم / ١٠٠ جم) كما فى الموز والبرتقال والخوخ والمشمش والتفاح والعنب والجريب فروت والليمون والطماطم والبلح ، وفى البصل والفاصوليا والكرنب والخس والفلفل والبطاطس والبطاطا ، وفى اللبن وعسل النحل والمولاس ، وفى لحم العجول وبعض أنواع السمك .

الدور الطبى والعلاجى :

١ - **وحدات حمض البانتوثينيك** :- بالوزن (ملجم) .

٢ - **المستويات الطبيعية فى الدم** :- تتراوح بين ١٩ و ٣٢ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل .

٣ - **المقررات الموصى بها منه** :- يوصى للبالغين بحوالى ١٠ - ١٥ ملجم / يوم ، وبالنسبة للحالات الخاصة (حمل ورضاعة) فيوصى بزيادة هذه الكمية على حسب الحالة .

٤ - **إعطاء حمض البانتوثينيك** :- الطريق الأمثل لإعطاءه هو تناوله عن طريق

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفم ، كما يمكن اعطاءه عن طريق الحقن فى الوريد أو العضل .

٥ - أعراض النقص :-

أ - **الأعراض العامة** :- وتتضمن أضطراب الحركات العصبية وأضطراب الأوعية القلبية cardiovasculars ، وأضطرابات هضميه ، وقابلية كبيرة للعدوى بالأمراض ، وضعف وهبوط فى القوى الحيوية والنشاط الوظيفى .

ب - **فى الفئران** :- انخفاض انتاج الأجسام المضادة ، وأضطرابات فى وظائف الكبد وفى الجلد (يصبح قرنى) ، وأخيراً التعب عند إداء أقل مجهود (كسل عام) .

حـ - **فى الدجاج** :- اضطرابات فى الجلد (قرنى) والكبد ، وعجز فى انتاج البيض والتكاثر .

٦ - أمراض النقص :

أ - **فى الفئران** :- عدم تلون الشعر achromatrichia ، تلون شعر الشوارب بلون أحمر دموى bloody whiskers ، وسقوط الشعر وصلع .

ب - **فى الكتاكيت** :- التهاب جلدى .

٧ - مصادره للأجناس التى تحتاج إليه :- كل الكائنات الحية تحتاج الى هذه الفيتامين .

أ - **المصادر الداخلية** :- فقط النباتات الخضراء والفطريات هى التى تخلقه بداخلها

ب - **المصادر الخارجية** :- كل الكائنات الحية الأخرى خلاف السابق ذكرها تحتاج إليه من مصادر خارجية . والإنسان يحتاج إليه من مصادر خارجية لأن البكتريا المعوية لا تخلقه .

٨ - تأثير الجرعات العالية منه :- غير سام بالنسبة للإنسان عند تناوله بكميات كبيرة ، أما فى الفئران عند اعطاءه بكمية كبيرة (١٠ جم / كجم) أدى إلى عجز فى القدرة على التنفس respiatory failure .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحليل حمض البانتوثينيك

أ - الفصل :

أهم المصادر التى يفضل أن يفصل منها (الغنية به) هى الأرز والكبد والخميرة والنخالة bran ، وطريقة استخلاصه تتضمن مايلى : -

١- أستخلاص الكبد بكحول إيثانول ٩٠٪ .

٢ - التخلص من القواعد العضوية بإدمصاصها على Fuller's earth .

٣ - ادمصاص الفيتامين على فحم نشط على درجة P^H ٣,٦ ، ثم إحلاله بالأمونيا .

٤- تستخلص صورة الأملاح شبه القلوية brucine بالكلوروفورم .

٥ - تحول صورة هذه الأملاح إلى ملح كالسيوم .

٦ - تنقى هذه الأملاح بالترسيب التجزيئى fractional precipitation من المذيبات العضوية .

ب - تقدير حمض البانتوثينيك :-

يقدر محتوى المواد الغذائية المختلفة من حمض البانتوثينيك بعدة طرق مختلفة وهى : القياس الميكروبيولوجى ، و التقدير الحيوى على الحيوانات ، و radiaimmunoassay (RIA)، والطرق الكيميائية .

١ - الطرق الميكروبيولوجية : - أول تقدير ميكروبيولوجى لحمض البانتوثينيك كان على الخميرة S. cervisiae ، وهذا التقدير كان يفتقر إلى التخصص لأن هذا الجنس من الخميره ينتج هذا الفيتامين بالفعل ، ولكن استخدمت بعد ذلك سلالات مختلفة من البكتريا لا يمكنها تخليقه ، منها L. bulgaricus , L. casei .

٢- الطرق الحيوية : - استخدمت الكتاكيت منذ القدم فى تقدير محتوى الأغذية من حمض البانتوثينيك (معدل النمو) ، ولكن مازالت تستخدم حتى الآن طرق التقدير الشفائية أو العلاجية curative assay فى الكتاكيت لأنها متاحة أكثر ومنخفضة التكاليف .

٣- القياس الاشعاعى المناعى (RIA) : - وهى حساسة جداً لتقدير تركيز المواد المختلفة الموجودة بكميات صغيرة جداً فى السوائل البيولوجية ، فهى تستخدم فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

التقدير الكمى للهرمونات والأدوية والفيتامينات . ولتقدير محتوى الدم الكلى من حمض البانتوثينيك ، يتم معاملته بأنزيم Alkaline phosphatase (AP) ومستخلص الكبد ، ثم تحليله بتكنيك الـ RIA (فى صوره kits) ، ومن هذا التحليل يمكن ايجاد تركيز الفيتامين . وقد قورنت هذه الطريقة بالطرق الميكروبيولوجية وتفوقت عليها .

٤ – **طريقة** Liquid scintillation : – استخدم هذا التكنيك لتحليل الفيتامين بطريقة ميكروبية ، وفى هذه الطريقة تحضن العينة فى بيئة تحتوى على كربون مشع ^{14}C ، ثم يتم مسك trap ثانى أكسيد الكربون المشع المتحرر من التفاعل بواسطة 2-phenylethylamine ويقدر فيه الاشعاع ، ومن كمية الأشعاع يقدر النشاط الأنزيمى (أوالميكروبى) الذى يعتمد فى تفاعله على هذا الفيتامين . هذا ، وقد أستخدمت هذه الطريقة لتقدير الثيامين والبيرودكسين وحمض البانتوثينيك .

٥ – **الطرق الكيميائية** : – طبيعة المركبات المعقدة المصاحبة للفيتامين تعوق من استخدام الطرق الكيميائية لتقدير حمض البانتوثينيك . وقد استخدم الـ GLC فى تقدير أملاح البانتوثينات والبانتوثينيل pantothenyl فى مستحضرات ومخاليط الفيتامينات.وفى هذه المستحضرات عادة ما يوجد الفيتامين فى صورة ملح الكالسيوم calcium pantothenate . ومن الصعب تحليل محتوى هذه المستحضرات من الفيتامين ويرجع ذلك إلى حدوث تداخل بين الفيتامينات وبعضها وإلى تأثيرات التخزين على حمض البانتوثينيك .

ويقدر الفيتامين لونياً أو بالفلورة بعد تحليله مائياً حيث ينتج بيتا الآنين β-alanine ، وملح حمض بانتويك pantoic acid . ويلزم استخلاص البيتا الآنين من العينة بعد التحليل المائى حتى يكون التقدير متخصصاً ، ويقدر البيتا الآنين بطريقة لونية أو فلوروماترية . ومن تركيزه يمكن ايجاد تركيز الفيتامين فى العينة .

٦ – **الطرق الأنزيمية** : – يعتبر هذا الفيتامين معاون لأنزيم (CoA transferase citrate codensing enzyme) ، فهو منشط لهذا الأنزيم ، حيث يدخل فى تركيب الـ CoA. وعند طريق تقدير نشاط هذا الأنزيم فى الكبد ، يمكن معرفة كمية الـ CoA وكذلك كمية الفيتامين .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تقدير بانتوثينات الكالسيوم بالطريقة الرسمية (A.O.A.C , 1975)

يمكن تطبيق هذه الطريقة على المستحضرات الطبية والصدلية ، وهذه الطريقة لا تميز بين الصـورتين D-and L-isomers . فلو أفـتـرضنا إن المخلوط الراسـيـمى racemic لبانتوثينات الكالسيوم يتكون من ٥٠:٥٠ (-D : - L) فلابد من قسمة النتائج المتحصل عليها على ٢ حتى نحصل على المحتوى النشط منها (الصورة - D) .

والأساس المبنى عليه تقدير البانتوثينات فى هذه الطريقة هو كسر جزىء البانتوثينات بالحمض فينتج من هذه المعاملة β-alanine ، الذى يعـامل بمحلول كلورة chlorinating solution ، ثم بيوديد بوتاسيوم KI ، فينفرد يود يقدر سبكتروفومترياً .

الجواهر الكشافة :-

١ - المبادل الأيونى : - Dowex 50W - × 4 (H^+ form) ; 100 - 200 mesh

٢ - المبادل الأيونى :- Florisil ; 60 - 100 mesh .

٣ - محلول بورات منظم borate buffer (٠,٠٥ M ، p^H ١٠,٥) :-

ويحضر بإذابة ٣,١ جم حمض بوريك Boric acid (AR) و ٣,٧ جـم KCl فى حوالى ٩٠٠ مل مـاء ، ثم تضبط درجة الـ p^H إلى ١٠,٥ بـالضبـط بـواسطة محلول NaOH (٢,٠ N) ثم يكمل إلى لتر بالماء المقطر .

٤ - مـحلول الكلورة chlorinating solution :- يخـفف حـجم واحـد من مـحلول NaOCl ٤ - ٦٪ مع ٣٠ حجم من محلول البورات المنظم ، ويحضر هذا المحلول يوم التقدير ، ويحفظ بعيداً عن الضوء .

٥ - محلول فينول محمض acidified phenol :- ٠,٥ ٪ فى حمض HCl (٠,١ N).

٦ - محلول يوديد بوتاسيوم KI : - محلول مائى ١ ٪ ، ويحضر كل أسبوع ، ويحفظ بعيداً عن الضوء .

٧ - محلول دليل فينول فيثالين phenolphthalein : -٠,٢ ٪ فى كـحـول ايثـايل أو كحول أيزوبروبيل .

٨ - محلول بانتوثينات الكالسيوم القياسى (٠,٥ ملجم / مل) : - ويحضر بإذابة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٥٠,٠ ملجم بانتوثينات كالسيوم قياسية USP فى ١٠٠ ماء ، ثم يخفف ١٠,٠ مل منه إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر . ويخزن على ١٠ ° م .

تجهيز الأعمدة الكروماتوجرافية : -

يتم تجهيز الأعمدة الكروماتوجرافية من زجاج البيركس (١٢ مم قطر خارجى × ٣٠٠ مم طول) والمزودة بأقراص كلسية خشنه coarse fritted disks ، وقمة مجهزة بحيث يمكن غلقها بالمطاط ، ثم تملء بالمبادلات كما يلى : -

يغسل كلا المبادلين بالماء لإزالة معظم الدقائق المصاحبة ويخزنا فى الماء لحين الأستعمال . ويستعمل عمودين لكل عينة مراد تحليلها وعمود ثالث للمحلول القياسى . يضاف لكل عمود الـ florisil إلى أرتفاع ٥ سم ثم يحشر insert بعدها طبقة رقيقة من الصوف الزجاجى glasswool ، ثم يضاف المبادل الآخر Dowex 50W -× 4 بأرتفاع ٥ سم أيضاً . يغسل المبادلين بحوالى ١٥ مل محلول حمض HCl (١ N) ثم يشطف بواسطة ١٥٠ مل ماء مقطر . هذا ، و يراعى تحضير أعمدة جديدة قبل كل تقدير.

التقدير : -

١ – يحضر محلول مائى من العينة بحيث تحتوى على ٠,٠٥ ملجم بانتوثينات كالسيوم لكل مل (وذلك على أساس التركيز المتوقع فى العينة) . قد تسخن الأقراص أو الكبسولات فى ماء لتسهيل الأستخلاص ، ويزال الغطاء الملون المغلف للأقراص بالغسيل بالماء بحذر شديد ، أما الكبسولات فمن السهل قطعها والحصول على مكوناتها للتحليل .

٢ – يؤخذ ١٠ مل من محلول العينة أو المحلول القياسى وتضاف إلى الأعمده الكروماتوجرافية ويتم أحلال كل منها بواسطة ٧٠ مل ماء فى دورق مخروطى سعه ٢٠٠ مل ، ثم يضاف إلى كل محلول ٥ مل محلول حمض HCl (٢ N) وتسخن فى الأتوكلاف لمده ٣٠ ق على ١٢١° م ، ثم تبرد وتخفف إلى ١٠٠ مل .

٣ – يحضر الـ sample blank بأضافة ١٠ مل من محلول العينة إلى عمود الفصل وتحل بواسطة ٧٠ مل ماء ، ثم يخفف البلانك إلى ١٠٠ مل بالماء .

٤ – يؤخذ ١٠ مل من كل من محلول العينة والمحلول القياسى (المعاملين حرارياً) ،

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ومن محلول sample blank وتنقل إلى دوراق سعة ٥٠ مل مزودة بغطاء زجاجى.

٥ – يضاف نقطتين من محلول دليل الفينول فيثالين لكل دورق ثم يعاير بواسطة محلول NaOH (٢ N) حتى اللون الأحمر وبعد ذلك يعاير رجعياً بواسطة محلول حمض HCl (٠,١ N) حتى نقطة عديم اللون .

٦ – يضاف مل واحد من محلول جوهر الكلورة لكل منها وتخلط ثم تقفل الدوارق وتترك لمده ١٥ ق ، وبعد ذلك يضاف مل واحد من محلول الفينول المحمض للقضاء على الهيبوكلوريت الزيادة ، ثم تحرك رحوياً لكى تغسل جوانب الدوارق الداخلية بالمحلول وتغلق ، وتترك ٥ ق .

٧ – يضاف مل واحد من محلول KI ، وبسرعة يضاف ٢٠ مل كحول مطلق لكل دورق (الاضافة تكون بسرعة لأن لون اليود يقل بسرعة فى المحلول المائى) .

٨ – تنقل المحاليل إلى دوراق معيارية سعة ٥٠ مل وتكمل للعلامة بواسطة الكحول المطلق وتخلط جيداً .

٩ – تترك الدوارق ١٠ ق أو أكثر حتى يظهر اللون إلى أقصاه ، ثم يقاس الامتصاص الضوئى للمحاليل على طول موجة ٣٥٨ nm فى الأسبكتروفوتومتر ضد reagent blank (0A) والذى يحتوى على ١٠ مل ماء وجميع الجواهر المستخدمة كما فى العينة والمحلول القياسى ولنفس الفترات . هذا ، فتحت هذه الظروف يكون لون اليود ثابت لمدة ٢٤ ساعة .

الحساب : –

يحسب تركيز بانتوثينات الكالسيوم فى العينة الأصلية من المعادلة التالية : –

$$\text{Conc. of Ca pantothenate in orginal sample} = \frac{A}{\acute{A}} \times \text{declared potency}$$

حيث أن : –

A = هى امتصاص العينة .

Á = هى امتصاص المحلول القياسى .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Folic acid – حمض الفوليك

تفاعلاته :

هذا الفيتامين ثابت لكل من القلويات والعوامل المختزلة ، ولكنه يتأثر بدرجة كبيرة بالحرارة (فى المحاليل) وبالأحماض وبالعوامل المؤكسدة ، ويذوب فى الماء وتأثيره حامضى فيها (p^H = ٤,٤) ، وثابت فى الماء ويوجد فى صورة أملاح صوديوم .

الذوبـان :

يذوب فى الماء بنسبة ضئيلة جداً (٠,٠١ ملجم / مل) ، وغير ذائب فى المذيبات القطبية (كحول ، أسيتون) والغير قطبية أيضاً (بنزين ، كلوروفورم ، إيثير) .

صوره وخواصه :

الصـورة النقية عبارة عن بللورات عدسية الشكل ، صفراء اللون ، والوزن الجزيئى له ٤٤١,٢ ، ويحترق قبل أن ينصهر على ٢٥٠°م ، و أقصى امتصاص له طول موجة ٢٨٢ و٣٥٠ nm على p^H = ٧,٠ .

انتشاره ومصادره :

١- **فى النباتات** :- تحتوى الفواكه على كمية صغيرة منه ، ولكنه يوجد بكثرة فى

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

أوراق الخضروات الطازجة والنقل مثل الفول السوداني ، وفى الحبوب مثل الشعير والشوفان والقمح والراى rye .

٢ - **فى الحيوانات** :- يوجد فى الكبد والكلى وفي الفراشات (فى صبغات الأجنحة xanthopterin) ، وفى حراشيف السمك ichthyopterin .

٣ - **فى الكائنات الحية الدقيقة** :- يوجد فى البكتريا المعوية والخميرة والفطريات والطحالب وعيش الغراب (المشروم).

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** : - (٩٠ - ٣٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) كما فى كبد البقر والخنزير والدجاج والحملان ، و فى السبانخ والقمح والنخالة والفول الجاف والخميرة .

٢ - **المصادر المتوسطة** :-(٣٠ - ٩٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) كما فى كلى البقر.

٣ - **المصادر القليلة** : - (من صفر إلى ٣٠ ميكرو جرام / ١٠٠جم) كما فى لحم كل من البقر، وفى الخنزير والبكان وجوز الهند ، وفى البنجر والجزر والكرنب والقرنبيط والأرز البنى والبصل وعش الغراب والحمص والفلفل والبطاطس والطماطم والخس والبامية والمسطردة .

الدور الطبى والغذائى:

١ - **وحدات حمض الفوليك** : - بالوزن (ملجم) .

٢ - **المستويات الطبيعية فى الدم** :- فى الإنسان يصل تركيزه ٣,٥٢ ميكرو جرام لكل ١٠٠مل .

٣ - **المقررات الموصى بها** :- للأطفال والبالغين قدرت بحوالى ٠,٤ ملجم لكل يوم ، والبكتريا المعوية تزود الإنسان بجزء كبير منها . وتزداد المقررات الموصى بها فى الحالات الخاصة مثل الحمل وفى فترات المرض .

٤ - **إعطاء الفيتامين** : - المسار الطبيعى والمفضل لاعطاءه هو عن طريق الفم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويمكن تناوله فى حالات خاصة بالحقن تحت الجلد .

٥ - **اعـــراض النقص** : - اضطرابات معوية ، و نقص كرات الدم البيضاء leukopenia والتهاب اللسان glossitis ، و فقر دم مصحوب بتضخم كرات الدم الحمراء macrocytic anemia ، وأنيميا خبيثة ، و إسهال sprue ، والتهاب اللثة ، و agranulosis (فى القرود) ، وقلة الريش (فى الدجاج) ، و كسل ونعاس وتشنجات (فى خنزير غينيا) ، و إستسقاء الرأس وتضخم الطحال (فى الفئران) .

٦ - **أمراض النقص** : - الأنيميا بأنواعها (خبيثة و تضخم كرات الدم الحمراء) والتهاب اللسان ، و إسهال ، و أضرار فى الجهاز الهضمى ، و سوء الامتصاص من الأمعاء الدقيقة .

٧ - **مصادره للأجناس التى تحتاج إليه** : - معظم الحيوانات تحتاج إليه من مصادر خارجية .

أ - **المصادر الخارجية** : - الفقاريات واللافقاريات وبعض البكتريا تحتاج إليه من هذه المصادر الخارجية ، والبكتريا المعوية تمد الإنسان والفئران والكلاب والأرانب والخنازير بما تحتاجه منه .

ب - **المصادر الداخلية** : - البكتريا المعوية والفطريات والخميرة تستطيع تخليقه ، لذلك فهى لا تحتاج إليه من المصادر الخارجية .

٨ - **تأثير الجرعات العالية** : - لم يقرر حتى الآن إن له سمية على الإنسان، ولكن فى الفئران فهى تسبب فشل كلوى وتشنجات . والجرعة المميتة للنصف LD_{50} هى ٦٠٠ ملجم / كجم من وزن الجسم ، والجرعات العالية تسبب وقف انقسام الخلايا فى طور الـ metaphase فى الكتاكيت .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تحليل حمض الفوليك

الفصل :

أهم المصادر التى يفصل منها حمض الفوليك هى السبانخ والكبد والخميرة والألفاألفا ونخالة القمح . ولابد أن يتم فصل الفولات folate من مصادرها الطبيعية تحت ظروف خاصة حتى لا تتأثر سلسلة oligo γ- glutamyl الجانبية للفولات وفى صورة مختزلة . ولكى تفصل أقصى كمية من الفولات بصورة سليمة ، يتم فرم mince العينة (كبد) ثم تسخينها على ٩٥ °م لمدة ١٠ ق فى وجود مواد مانعة للأكسدة antioxidants ، وذلك حتى تتلف أنزيمات تمثيل الفولات وأشهرها(γ - glutamyl hydrolase (conjugase . ثم بعد ذلك يتم تجنيس العينة فى وسط مائى على درجة pH = ٣,٠ . وتستعمل المواد المانعة للأكسدة حتى تحمى الفولات من الأكسدة ويكون فى صورة مختزلة . ومن أنسب هذه المواد أسكوربات الصوديوم (١٪) أو" ME " 2-Mercaptoethanol (٢, M٠) وحيث أن الفولات ترتبط مع الجزيئات الكبيرة برابطة تعاونية مثل serum binding protein والأغشية الحيوية membranes ، فلابد من معاملة المستخلص بالحرارة حتى تتحرر الفولات من هذه الجزيئات ، ثم بعد ذلك يستخدم تكنيك الادمصاص حتى نحصل على الفيتامين فى صورة نقية . ويتم ذلك كما يلى :

١ – الادمصاص على Norite ثم الأحلال بايثانول – أيدروكسيد أمونيوم .

٢ – الادمصاص على Superfiltrol (pH = ١.٣)، ثم الاحلال بنفس المذيب السابق .

٣ – الترسيب بواسطة آايونات الباريوم Ba^{++} على درجة pH = ٧,٠ فى كحول .

٤ – أسترته مع ميثانول ثم استخلاصه بالبيوتانول العادى .

٥ – الادمصاص على Superfiltrol (pH = ٧,٠) ، ثم أحلال الاستر بواسطة أسيتون ٧٥ ٪ .

٦ – البللورة مع الايثانول الساخن ، ثم تحليل الاستر مائياً .

٧ – اعادة البللورة فى ماء ساخن .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

هذا ، ويمكن أستخدام كروماتوجرافى الأعمدة فى خطوات الأدمصاص السابق ذكرها .

طرق التحليل :

تختلف طرق تحليل الفولات عن بعضها، فبعض الطرق تستخدم لمعرفة نوع وحدة الكربون المرتبطة بالفولات والصورة المختزلة للفولات ، والبعض الآخر يستخدم لمعرفة طول سلسلة الأوليجوجلوتاميل ، أو لتحليلهما معاً . وتعتمد الطرق المستخدمة أيضاً على صور الفولات الغير متجانسة والغير معروفة أيضاً .

١ - الطرق الكروماتوجرافية : -

لو كانت الفولات المجهولة خليط من صور رئيسية وثانوية عديدة ، فلابد أولاً من تفريدها على عمود كروماتوجرافى أنيونى anionic مثل - DEAE (diethylaminoethyl) cellulose بأستعمال محلول ملحى متدرج فى التركيز . بعد هذه التنقية الجزئية ، يمكن تمييز الصورة الرئيسية عن بعضها البعض ، فتقدر صورة الفولات المختزلة والتى تحتوى على وحدة كربون بعد أزالة سلسلة الأوليجوجلوتاميل منها بتحضينها مع أنزيم γ-glutamylhydrolase ، ثم تطبيقها على عمود كروماتوجرافى يحتوى على - DEAE cellulose ، ومقارنة الـ peak الناتج مع فولات أحادية الجلوتامات قياسية . ويمكن تقدير طول سلسلة الأوليجوجلوتاميل بالتحليل الكروماتوجرافى مباشرة للفولات المنقاة على عمود سيفادكس G - 25 . ويمكن أيضاً تمييز سلسلة الأوليجوجلوتاميل وتحديد طولها بعد كسرها من الفولات وأنتاج سلسلة p - aminobenzoyl-γ-oligoglutamylate (PABAGlun) ثم تقاس هذه السلسلة بمفردها بأستعمال عمود كروماتوجرافى DEAE-cellulose أو تقاس بعد تحويلها إلى صبغة أزو مطابقة ثم تحلل كروماتوجرافياً على جيل عديد الأكريل اميد polyacrylamide . وكسر الفولات يتأثر بنوع الطريقة المستخدمة سواء أختزالية بأستعمال الزنك فى حمض ، أو تأكسدية بأستعمال البرمنجنات فى قلوى ، فكلا الطريقتان تكسران كل أنواع الفولات كمياً . وهناك طريقة أخرى لتحليل السلسلة الجانبية (الأوليجوجلوتاميل) وهى تتضمن تحويل كل صور الفولات إلى 5-methyltetrahydrofolate ثم تحليلها كروماتوجرافياً. هذا، وأستخدم حديثاً تكنيك الـHPLC فى فصل وتمييز الفولات أحادية أو عديدة الجلوتامات من المصادر الطبيعية .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ - الطرق الفلورومترية : -

وفيها تقاس فلورة حمض الفوليك النقى على طول موجة ٤٧٠ nm .

٣ - الطرق الكيميائية : -

وفيها يقدر الأمين العطرى بعد تكسير حمض الفوليك بالزنك والحمض ، وذلك بتحويل الأمين العطرى إلى مشتق آزو azo ملون بلون بنفسجى .

٤ - الطرق الميكروبيولوجية والحيوية : -

يمكن تقدير محتوى المصادر الطبيعية من الفولات أو الأنواع المختلفة من الفولات والمتحصل عليها من التحليل الكروماتوجرافى بالطرق الميكروبيولوجية . ويمكن الكشف عن أقصى نشاط لإزالة سلسلة الأوليجوجلوتاميل بأنزيم الـ conjugase عن طريق التقدير بأستخدام بكتريا L. casei . وهذه الطريقة تعطى أقصى نشاط للفولات لذلك فهى تقدر الفولات الكلية . وتستخدم خطوة التحليل المائى بالأنزيم لأن البكتريا لا يمكنها الاستفادة من الفولات ذات السلسلة الجانبية الطويلة لذلك فلا تستطيع النمو . ويمكن تقدير الفولات الحرة والمرتبطة بالفرق بين التقدير قبل وبعد التحليل المائى بأنزيم الـ conjugase . ويمكن تقدير 5- methyltetrahydrofolate – باستخدام السلالة L . faecalis . وفيها أيضاً تعامل الفولات بأنزيم conjugase قبل التقدير . وهناك بكتريا حمض لاكتيك أخرى لا تستجيب للصورة الغير مختزلة للفولات (Pte Glu) ولاتستجيب أيضاً لـ 5-methyl-H_4PteGlu الـ H وهى P. cerevisiae . وهذا الميكروب مفيد فى التحليل الكروماتوجرافى للفولات المجهولة حيث يمكن معرفة هذه المشتقات من الفولات بعد فصلها لعدم استجابة البكتريا لها . وأخيراً كانت تقدر الفولات بالطرق الحيوية على الكتاكيت بقياس معدل تكوين الريش فيها feathering ، وفى الفئران بقياس معدل تطور قناة التبويض oviduct .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

فيتامين ب١٢ – Vit- B_{12}

$CH_2-CH_2-CONH_2$ CH_3 CH_2CONH_2 CH_3 C NH_2CO-CH_2 I II $CH_2-CH_2-CONH_2$ H_3C N N H_3C CN Co^{+} CH NH_2CO-CH_2 N N CH_3 IV III CH_3 CH_3 $CH_2-CH_2-CONH_2$ CH_2 CH_2 C CH_3 CH_3 C=O CH-CH_2-NH O O^{-} P O O HO N CH_3 N CH_3 H H H HO-CH_2 O H

5,6-Dimethylbenzimidazole moiety

تفاعلاته :

هذا الفيتامين يتأثر تقريباً بكل العوامل ، فهو غير ثابت تجاه كل من الحرارة والأحماض والقواعد والعوامل المؤكسدة والمختزلة والضوء أيضاً . وتأثيره متعادل ، وهو عامل مختزل ، وهو أيضاً قاعدة عديدة الحامضية polyacidic base .

الذوبان :

يذوب فى الماء بنسبة متوسطة (١,٢٥ جم / ١٠٠ مل) وفى الكحول أيضاً ، ولكن غير ذائب فى الأسيتون والمذيبات الغير قطبية (بنزين ، إيثير ، كلوروفورم) .

صوره وخواصه :

صورته النقية عبارة عن مسحوق أحمر ، وصورته البللورية أبرية ذات شكل معينى والوزن الجزيئى له يبلغ ١٣٥٧ ، ويسود على ١٩٠° م قبل أن ينصهر ، وأقصى أمتصاص له

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

على ٣ أطوال موجية مختلفة وهى ٢٧٨ و ٣٦١ و ٥٥٠ nm (فى الماء) .

انتشاره ومصادره :

١ - **فى النباتات** :- تركيزه منخفض جداً فى الخضروات والبذور والنقل ، ويوجد فى الجزر والحمص والفول الأخضر والقمح وفول الصويا .

٢ - **فى الحيوانات** :- يوجد فى كل الحيوانات خصوصاً الأعضاء النشطة وهى الكبد والكلى والقلب والطحال والمخ والمعدة والأمعاء ، ويوجد أيضاً فى المنتجات الحيوانية مثل البيض واللبن .

٣ - **فى الكائنات الحية الدقيقة** :- يوجد فى بعض البكتريا والبكتريا المعوية وبكتريا التربة والبروتوزوا .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** :- (٥٠ - ٥٠٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) وتشمل كبد كلٍ من البقر والعجول والحملان والخنازير ، وفى كلى البقر والحملان ومخ البقر .

٢ - **المصادر المتوسطة** :- (٥ - ٥٠ ميكروجرام / ١٠٠ جم) فى كلى الأرانب وكبد الأرانب والدجاج وقلب البقر والأرانب والدجاج والضأن وفى الجبن واللبن والبيض .

الدور الطبى والغذائى :

١ - **وحدات فيتامين ب ١٢** :- وحدة USP = ١ ميكروجرام فيتامين ب١٢ وتساوى أيضاً ١١٠٠٠ وحدة LLD (L . lactis Dorner) .

٢ - **المستويات الطبيعية فى الدم (الإنسان)** :- تقاس مستوياته فى سيرم دم الإنسان بالبيكوجرام pg لكل مل . والمستوى الطبيعى يتراوح بين ٢٠٠ - ٩٠٠ بيكوجرام / مل ، وأقل من ١٠٠ بيكوجرام لكل مل سيرم تعتبر حالة نقص فيتامين ب١٢ . وعادة ما يفضل استخدام هذه الوحدات (بيكوجرامات) نظراً لقلة تركيزة والحاجة إليه . متوسط مستواه فى الدم يصل حوالى ٠,٠٨ ميكرو جرام لكل ١٠٠ مل ، و ٠,٠٣ ميكروجرام لكل ١٠٠ مل سيرم .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣ - **المقررات الموصى بها** : - يوصى للأطفال بـ ٢,٥ ميكروجرام لكل يوم ، وللبالغين ٥,٦ ميكروجرام لكل يوم . وتزداد فى الحالات الخاصة ، ففى الحمل يوصى بـ ٨ ميكروجرام / يوم ، وفى الرضاعة يوصى بـ ٦ ميكروجرام / يوم . كما تزداد الجرعة فى حالات أمراض سوء الامتصاص المعوى وكبر السن وسوءالتغذية ومدمنى الكحول alcoholism وحالات فقد الشهية للطعام والأمراض العصبية neurophathies .

٤ - **اعطاء فيتامين ب ١٢** : - الطريق الرئيسى لاعطاءه هو مع الطعام خلال الفم ، ولكن عند أعطاءه فى حالات نقصه يفضل بالحقن فى العضل .

٥ - **أعراض النقص** : - ضعف النمو ، و زيادة تحلل كرات الدم الحمراء ، وأنيميا مصحوبة بتضخم كرات الدم الحمراء ، والتهاب اللسان ، وأمراض عصبية وانخفاض ليبيدات الدم والأنسجة ، واضطراب التمثيل الغذائى للكربوهيدرات ، وافراز methylmalonic acid ، وتغييرات فى الجهاز الهضمى ، و ضخم النخاع. وفى الدجاج الأعراض هى : - ضعف تكوين الريش وأنخفاض نسبة فقس البيض . وفى الفئران الأعراض هى : - فقد القدرة على التكاثر ، وتغييرات كبيرة فى الشوارب porphyrin whiskers . وفى الخنازير الأعراض هى : - التهاب جلدى ، وفقد القدرة على التناسل أيضاً .

٦ - **أمراض النقص** : - الأنيميا بأنواعها (حادة - تضخم كرات الدم الحمراء hyperchrmic) ، واسهال ، والتهاب اللسان ، وتثبيط النمو ، وأنحلال الحبل الشوكى .

٧ - **مصادره للأجناس التى تحتاج إليه** : - معظم الفقاريات وبعض البروتوزوا والبكتريا والطحالب تحتاج إليه .

أ - **المصادر الخارجية** : - معظم الفقاريات تأخذه من مصادر خارجية (لا يتيسر للانسان عن طريق البكتريا المعوية) ، و بعض البكتريا تحتاجه من الخارج ولا تستطيع تخليقه .

ب - **المصادر الداخلية** : - باقى أنواع البكتريا تخلقه بداخلها وكذلك الـ actinomycetes .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٨ - **تأثير الجرعات العالية** :- تؤدى إلى زيادة عدد كرات الدم عن الحد الطبيعى بدرجة كبيرة polycythemia ، وعادة ما يكون تأثيرها العام ضعيف .

تحليل فيتامين ب ١٢

الفصل :

أهم المصادر المستخدمة لفصله هى الكبد و fish solubles ، وتتضمن طريقة الفصل ما يلى : -

١ - الاستخلاص بكحول مائى .

٢ - ادمصاص فيتامين ب ١٢ على فحم نشط ثم احلاله بكحول ٦٥ ٪ .

٣ - الادمصاص على عمود كروماتوجرافى يحتوى على سيليكا أو ألومينا .

٤ - الغسيل بالأسيتون ثم الأحلال بالكحول .

٥ - البللورة .

طرق التقدير :

١ - **طرق التقدير الأكلينيكية** clinical :- عندما فصلت بللورات فيتامين ب١٢ أول مرة سمى بالعامل المضاد للأنيميا الخبيثة (APA) antipernicious anemia ، وتم تقديره بصعوبة بطريقة نصف كمية فى مرضى بالأنيميا الخبيثة عن طريق قدرته على زيادة عدد كرات الدم الحمراء والهيموجلوبين ، وزيادة النسبة المئوية لـ reticulocytes .

٢ - الطرق الكيميائية : -

أ - **الطرق الأسبكتروفوتومترية** : - وهذه الطريقة سريعة ودقيقة وتعتمد على امتصاص السيانوكوبلامين cyanocobalamine على طول موجة ٣٦١ nm.. ويمكن لهذه الطريقة تقدير ٢٥ ميكرو جرام / مل . وكثير من مشابهات الكوبالامين لها امتصاص على طول موجة ٣٦١ nm ، لذلك فهذه الطريقة مفيدة لتقدير فيتامين ب١٢ الكلى بشرط أن تكون العينات نقية وخالية من إى مواد متداخلة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ب – **الطرق اللونية** : – من أهم الطرق الحساسة لتقدير السيانوكوبلامين تعتمد على تقدير محتوى السياند cyanide ، حيث يتم تحرير السياند بالأختزال أو بالتحليل الضوئى photolysis ، ثم يقاس بعد ذلك بطرق لونية حساسة . وبالطبع فهذه الطريقة لا تميز بين السيانوكوبلامين والمشابهات التى تحتوى على سيانيد . وقد اقترحت طريقة مناوبة لذلك وهى تعتمد على الفرق بين طيف السيانوكوبلامين ومعقده من ثنائى السيانيد ذو اللون البنفسجى . وهناك طرق لونية أخرى تعتمد على وجود 5,6-dimethylbenzimidazole وعلى نواتج التحليل المائى الناتجة من معاملة السيانوكوبلامين بحمض HCl القوى، ومع أن هذه الطرق الكيميائية دقيقة وحساسة جداً ، إلا أنه يستلزم لها وقت طويل و مملة ، وعلى ذلك فهى لا تحبذ للتقديرات الروتينية لعدد كبير من العينات .

٣ – **الطرق الميكروبيولوجية** : – الطرق الميكروبية لتقدير السيانوكوبالامين حساسة ويمكن تطبيقها على المواد الخام مباشرة . وهى واسعة الأنتشار وتستخدم عملياً لتقدير محتوى الفيتامين فى عينات الدم والأنسجة . ولكن هناك مشكلة لتخصصها حيث أن مشابهات الكوبلامين تعطى أستجابات مختلفة للكائنات الحية الدقيقة ، وأول ميكروب أستعمل فى تقدير السيانوكوبلامين كان E. coli ، وتكنيكه كان صعباً جداً ، ثم بعد ذلك وجدت أنواع أخرى من نفس السلالة أكثر استجابة . أما الـ Lactobacilli فإنها تستجيب للمشابهات المختلفة من الكوبلامين والثيميدين thymidine وتستجيب أيضاً لنيكوسيدات الدى أوكسى الأخرى . واستخدمت الـ E. coli فى التقدير أيضاً ولكنها أقل حساسية وتستجيب لمشابهات عديدة ولا تستجيب لنيكلوسيدات الدى أوكسى . ومن كل الكائنات المختبرة وجد أن E. gracilis هو الأكثر حساسية لتقدير السيانوكوبلامين ، ومن أهم مميزاته أن نموه بطىء ، ويتطلب ٥ أيام لأقصى نمو. وتكنيك الطرق الميكروبيولوجية يتطلب عدة أيام ويجب الحذر من تطبيقه على عينات المرضى الذين يتناولوا أدوية تؤثر على نشاط البكتريا مثل المضادات الحيوية .

٤ – **الطرق الحيوية** : – وهى تتضمن استخدام حيوانات راقية ، وعلى ذلك فهى أكثر صعوبة ويستلزم لها وقت طويل بالمقارنة بالطرق الميكروبيولوجية . والمشكلة الكبيرة تتركز فى تخزين كميات كبيرة منه فى الحيوانات الصغيرة النامية والتى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

قد أستمدتها من الأم . ويتم التغلب على هذه المشاكل بأضافة عوامل أجهاد stress factor لزيادة أستنزاف الفيتامين ، أو التغذية على علائق تزيد متطلبات الحيوان من الكوبلامين . والتقدير بأستخدام الكتاكيت هو الأكثر أستعمالاً عن الفئران فى هذا النوع من التجارب .

ه – Radioisotope dilution – ويتم فيها تحرير الكوبلامين أولا من المادة المرتبطة به ثم قياس الأشعاع بعد أرتباط السيانوكوبالامين مع أماكن أرتباط معنيه على بروتين خاص . وهذه الطريقة سهلة وحساسة ، و تستخدم حالياً فى صورة محاليل جاهزة kits. وعند تحليل عينة الدم، يلزم أولاً أستخلاص الكوبلامين المرتبط من عينه السيرم ثم تحويله إلى سيانوكوبلامين ، وأخيراً يتم أرتباطه مع ليجاند خاص cobalamine ligand وهو بروتين أرتباط binding protein ذو تخصص وتآلف عالى جداً للفيتامين . وهذه الطريقة هى المفضلة لتقدير الكوبلامين ، حيث لوحظ أن أكثر من ٩٠ ٪ من تقديرات الكوبلامين كانت بهذه الطريقة . وتوصى الجهات البحثية والمعنية بأستخدام هذه الطريقة .

الاختبار اللوني لفيتامين ب١٢

(Stroev and Makarova , 1989)

يعتمد الأختبار على خاصية الكوبلامين التى هى جزء تركيبى فى فيتامبن ب١٢ ، فهذا الشق يتفاعل مع الثيويوريا ويعطى معقد ملون بلون أخضر على درجة الحرارة المرتفعة .

الجواهر الكشافة : –

١ – محلول فيتامين ب١٢ (متوافر فى أمبولات صيدلية) .

٢ – بللورات ثيويوريا ، ويستعمل محلول ١٠ ٪ منها حديث التحضير .

التكنيك : –

١ – على ورقة ترشيح خالية من الرماد ashless filter paper ، يوضع نقطتين أو ثلاث نقط من محلول الثيويوريا (١٠ ٪) ، ثم تجفف بأستعمال تيار مستمر من الهواء الساخن (يمكن التجفيف أعلى اللهب الهادىء) .

٢ – توضع نقطة أو نقطتين من محلول فيتامين ب١٢ على spot الثيويوريا ثم تجفف

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مرة أخرى .

٣ - يلاحظ تكون حلقة لونها أخضر .

تقدير النقص فى فيتامين ب ١٢ (Varley et al. , 1976)

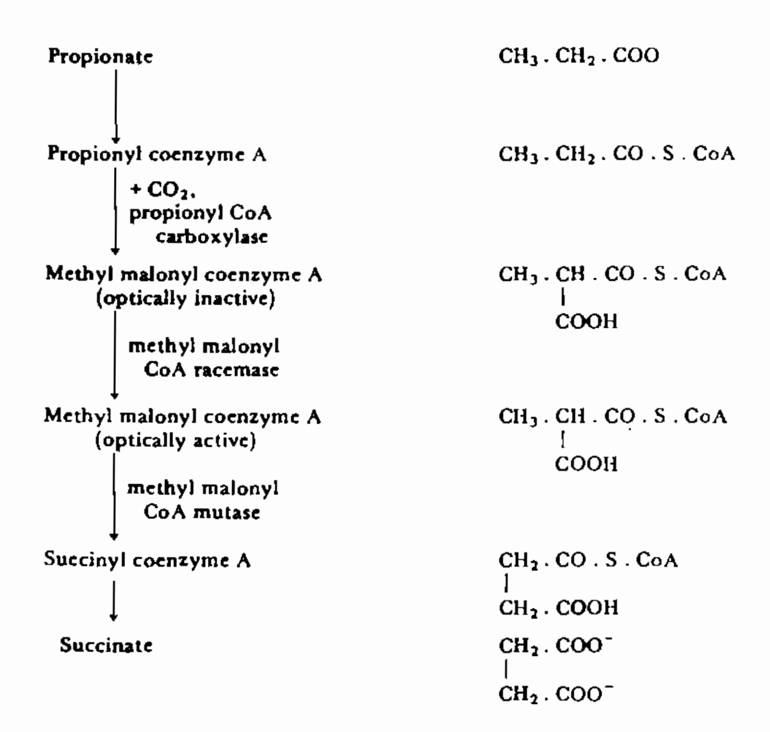
هناك معاونات أنزيمية هامة يدخل فى تركيبها الكوبلامين وهى : -

١ - معاون الأنزيم 5 - methyltetrahydrofolate (THF) methyltransferase والذى يسمح لـ 5 - methyl THF (الصورة المختزنة للفولات) بأن تدخل إلى دورة الفولات folate cycle .

٢ - معاون أنزيمى لميثيلة methylation الحمض النووى soluble RNA .

٣ - معاون أنزيمى فى تحول الـ methylmalonyl coenzyme A إلى succinyl coenzyme A (بواسطة أنزيم methylmalonyl Co A mutase) ثم إلى سكسينات succinate (شكل ٣٤) . والطرق التى تتعرض لدراسة نقص فيتامين ب١٢ نوعين ، الأولى مباشرة ويقدر فيها تركيز فيتامين ب١٢ مباشرة فى السيرم أو الكبد بطريقة ميكروبيولوجية والتى تستخدم فيها L . leichmannii أو E . gracilis . والنوع الثانى من الطرق هى الطرق الغير مباشرة indirect ، وفيها يقدر المفرز من حمض الميثايل مالونيك (MMA) mythylmalonic acid فى البول خصوصاً بعد اجراء valine loading . ففى الظروف العادية يمثل الحمض الأمينى فالين valine إلى بروبيونات propionate ومنه إلى السكسينات، والأخيرة تدخل إلى دوره كرب . ولكن فى حالة نقص فيتامين ب١٢ وعند إعطاء جرعة كبيرة من الفالين (valine loading) عن طريق الفم (١٠ جم) فإنه لا يمثل كما ينبغى، وتتراكم موادتفاعل substrate الأنزيم الذى يعاونه فيتامين ب١٢ ، وهى methylmonic acid وتفرز فى البول . والطريقة التالية تتناول تقدير هذا الحمض لونياًفى البول .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com



Conversion of propionate to succinate.

شكل (٢٤) مسار تحول البروبيونات الى سكسينات

الجواهر الكشافة : -

١ - المبادل الايونى (Deacidite FF (1 P) (mesh ٢٠٠) ، فى صورة كلوريد : -. ويغسل المبادل بالماء كميته مقدارها ٥ أضعاف كمية المبادل ، ويغسل ٣ مرات ، ثم يحفظ فى صورة معلق مائى فى زجاجات بنية على درجة حرارة الغرفة .

٢ - ايثير ثنائى الايثايل : - ويغسل بحـــوالى عشر (١/١٠) مــن حجمه بمحلول NaOH (٥ مول / لتر) ، ثم بالماء حتى يصبح ماء الغسيل متعادلاً .

٣ - حمض HCl : - ١٠ و ١٠٠ m mol / لتر وحمض مركز .

٤ - محلول NaOH (٣ mol / لتر) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٥ – محلول خلات منظم (١ mol / لتر ، p^H = ٤,٣) : – ويحضر بخلط ٤٢ مل حمض خليك ثلجي و ٢١,٨ جم خلات صوديوم لا مائية ويكمل إلى لتر بالماء المقطر .

٦ – محلول أيدروكسيد أمونيوم (٥ mol / لتر) : – يخفف ٢٥٠ مل من محلول الأمونيا المركزة (الكثافه النوعيه ٠,٨٨) إلى لتر بالماء المقطر .

٧ – جوهر الداى آزو diozo : – ويحضر كما يلى : –

أ – محلول p - Nitroaniline : – يذاب ٧٥٠ ملجم منه فى لتر محلول HCl تركيزه ٢٠٠ m mol / لتر .

ب – محلول نيتريت صوديوم Sod . nitrite (٠.٥ جم / لتر) ويحفظ على ٤° م .

جـ – محلول خلات صوديوم ٢٠٠ m mol / لتر .

تبرد المحاليل السابقة إلى ٥°م ، ثم يحضر الجوهر بخلط أربعة حجوم من محلول نيتريت الصوديوم و ١٥ حجم من محلول P-Nitroaniline ، ثم ٥ حجوم من محلول الخلات وتخلط جيداً . ويحفظ على ٥°م لمدة لا تزيد عن ١٢ ساعة .

٨ – محلول stock st . of methylmalonic acid (١٠ m mol / لتر) : – ويحضر بإذابة ١١٨,١ ملجم / ١٠٠ ملى ماء ، ويحفظ على ٤° م .

٩ – محلول working st. (٠,١ m mol / لتر) : – يخفف المحلول الـ stock بنسبة حجم إلى ١٠٠من محلول حمض HCl (١٠٠ m mol / لتر).

١٠ – كحول أميل amyl alcohol .

١١ – كبريتات صوديوم لا مائية .

التكنيك : –

١ – يعطى الشخص ١٠ جم فالين ، وبعدها يجمع البول المفرز خلال ٢٤ ساعة بدون مادة حافظة .

٢– يحمض ٥ مل من البول بواسطة حمض HCl المركز حتى درجة P^H = ٢ ، وتستخلص ثلاث مرات بالايثير (٥٠ مل ، ١٥ ق لكل مرة) . ويجرى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الاستخلاص فى جهاز رج ميكانيكى .

٣ – يحضر عمود كروماتوجرافى (٦ × ١,٥ سم) ويملء بالمبادل الآيونى فى ماء .

٤ – تضاف المستخلصات التى تم تجميعها والتى سبق معاملتها بالأمونيا combined ammoniacal extracts إلى العمود ، وبعد أن تمرر خلال المبادل ، يغسل المبادل بـ ٥٠ مل ماء ، ثم بـ ٥٠ مل حمض HCl (١٠٠ m mol / لتر)، ولابد أن تكون درجة الـ p^H للمحلول الخارج من العمود حوالى ٥ .

٥ – يتم عمل احلال لحمض الميثايل مالونيك بواسطة ٢٥ مل حمض HCl (١٠٠ m mol / لتر) ، ويمكن بعد ذلك اعادة تنشيط المبادل بـ ٥٠ مل حمض HCl (١٠٠ mmol / لتر) ، ثم بـ ٥٠ مل ماء .

٦ – إلى ثلاث أنابيب اختبار مزودة بغطاء زجاجى (١٠٠ × ١٦ مم) ، يضاف ١,٥ مل محلول خلال منظم ثم يضاف إلى الأولى ١,٠ مل من المحلول المحل الخاص بالعينة ، وهى تمثل بذلك الـ test . وإلى الثانية ١,٠ مل محلول القياسى وهى تمثل .St وإلى الثالثة يضاف ١,٠ مل حمض HCl (١٠٠ m mol / لتر) وهى تمثل البلانك .

٧ – يضاف لكل الأنابيب ١,٥ مل جوهر diazo حديث التحضير ، ثم تخلط جيداً وتوضع فى حمام مائى على ٩٥ ± ١° م لمدة ٢,٥ ق بالضبط ، ثم تبرد فى ماء لمدة دقيقة واحدة .

٨ – يضاف لكل أنبوبة مل واحد من محلول NaOH ، وبعد الخلط الجيد يضاف ٣ مل كحول أميل وتترك ١٠ ق ، ثم تغطى وترج جيداً وبشدة لمدة دقيقة .

٩ – وبعد أن تفصل الطبقتين ، تسحب الطبقة السفلى بعملية مص suction ، ثم يضاف حوالى ٢,٠ جم كبريتات صوديوم لا مائية إلى الطبقة العضوية وترج جيداً لإزالة ما بها من ماء .

١٠ – تتم عملية طرد مركزى وتنقل المحتويات إلى خلايا القياس وتقاس كثافة اللون على طول موجة ٦٥٠ nm ضد الماء . ولابد أن يكون امتصاص البلانك يقع بين ٠,٠٢ – ٠,٠٥ والمحلول القياسى بين ٠,٦٠ – ٠,٦٥ لمسار ضوئى مقداره ٨

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

mm . وإذا كان أمتصاص العينة المختبرة كبير ، تخفف بكحول الأميل أو يعاد التقدير بأستعمال كميات أقل من المحلول المحل .

١١ – يمكن أختبار كفاءة أسترجاع recovery حمض الميثايل مالونيك عن طريق أضافة ٠,٥ مل من محلول الـ stock st . إلى ٥ مل بول محمض قبل تطبيق هذه الطريقة ، ولابدأن يكون الأسترجاع يعادل ١٠٠ ± ١٠ .

الحساب : –

يحسب تركيز حمض الميثايل مالونيك فى البول من المعادلة التالية : –

$$\text{Urinary methylmalonic acid (m mol / l)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times \frac{25}{5} \times 0.1$$

$$= \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times 0.5$$

$$\text{Urinary methylmalonic acid (mg /l)} = \frac{\text{Reading of unknwn}}{\text{Reading of standard}} \times 59$$

التفسير : –

فى حالة الأشخاص الطبيعيين يكون المفرز من MMA هو ٣٥ Umol لكل ٢٤ ساعة (من صفر إلى ٤ ملجم / ٢٤ ساعة) فى حالة التقدير بطرق الـ GLC ، وتزداد إلى المستوى الأعلى إلى ٧٨ µ mol / ٢٤ ساعة (٩,٢ ملجم / ٢٤ ساعة) لو أستعمل internal standards . وهذه المستويات لا تزيد لو طبق الـ valine loading . أما الطرق اللونية فهى تعطى نتائج عالية ، ربما ترجع إلى قلة التخصص . والمستويات تحت هذه الظروف تكون من صفر إلى ٣٩ µmol / ٢٤ ساعة (من صفر إلى ١١ ملجم لكل ٢٤ ساعة) بدون valine loading . وقد تصبح حوالى ٠,٢١ m mol / ٢٤ ساعة (٢٥ ملجم / ٢٤ ساعة) بعد جرعة فالين مقدارها ١٠ جم ، ولكنها أيضاً فى المدى الطبيعى . أما فى حالة نقص فيتامين ب١٢ فيرتفع الـ MMA من ٠,٣٤ إلى أكثر من ١٠ m mol لكل ٢٤ ساعة (من ٤٠ ملجم / ٢٤ ساعة إلى عدة جرامات لكل ٢٤ساعة) .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

حمض الأسكوربيك (فيتامين جـ) - L-Ascorbic acid (Vit.C)

$$\text{L- Ascorbic acid} \underset{+ H_2}{\overset{- H_2}{\rightleftharpoons}} \text{L- Dehydroascorbic acid}$$

L- Ascorbic acid L- Dehydroascorbic acid

كما هو معروف أن حمض الأسكوربيك له خواص حموضة واختزال قويين ، ففي المحاليل المائية (فيتامين ذائب في الماء) تتأكسد الأسكوربات ascorbate بسرعة بواسطة الهواء الجوى إلى dehydro-L-ascorbate خصوصاً في وجود الآيونات المعدنية مثل Cu^{2+} . وكلا الصورتين نشطتين حيوياً ويتحولا لبعضهما البعض في الجسم . ومعدل أكسدة الأسكوربات (in vitro) يزداد بزيادة درجة الـ P^H ولكن على درجة p^H أعلى من ٥ تخضع الـ dehyolroascorbate أيضاً لعملية أكسدة اضافية زائدة حيث يتم فتح الحلقة ويفقد النشاط الحيوى ، والناتج من هذه الأكسدة هو dioxo-L-gulonate والذى يتحول تلقائياً إلى L-threonate و oxalate كما يلي : -

L - Ascorbic acid ⇌ Dehydre-L-ascorbic acid → Dioxo-L-gulonic acid → Oxalic acid + L- Threonic acid

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

ومما هو جدير بالذكر ، إن فيتامين جـ لا يحتوى على مجموعة كربوكسيل حرة ولكنها فى صورة أستر داخلى (لا كتون) ، وعلى ذلك فالخواص الحامضية لهذا الفيتامين لا ترجع لهذه المجموعة ولكنها ترجع إلى مجموعة الهيدروكسيل OH – الموجودة على ذره الكربون رقم (٢) . فهذه المجموعة محصورة بين مجموعة كربونيل (الذرة رقم ١) ومجموعة الـ OH الأخرى (على الذرة رقم ٣) ، وتهجين ذرات الكربون الثلاث الأولى من نوع SP^2 ، فتحت هذه الظروف تتأين مجموعة الـ OH – التى على الذرة رقم ٢ مفردة بروتون (H^+) ، وبذلك يكون هناك تأثير حامضى ويكون ملح مع أيونات العناصر المختلفة (Na^+ و K^+ .....إلخ) .

الحيوانات كلها فيما عدا الإنسان والحيوانات الرئيسية (مثل القرود والشمبانزى) وخنزير غينيا ، يمكنها تخليق الأسكوربات حيوياً فى جسمها من الجلوكوز ، أما التى لا تستطيع تخليقه فإنها تعانى من نقص فى أنزيم L- gulonolactone oxidase ، لذلك فلا يخلق فى أنسجتها .

فى الإنسان تمتص الأسكوربات وصورتها المؤكسدة بسرعة من المعدة stomach ، ومن اللفائفى ileum (الجزء الأخير من الأمعاء الدقيقة) ، ويدخل الى الدورة الدموية . وتنفذ الأسكوربات إلى خلايا عديدة عن طريق الأنتقال الغير نشط passive transportation ، بينما فى الصفائح الدموية platelets وفى خلايا الغدة الكظرية adrenal gland وخلايا شبكية العين retinal cells فإنه ينفذ خلالها عن طريق ميكانيكية النقل النشط active transportation . تنفذ الـ dehydroascorbate بحرية إلى الخلايا وتثبت فى صورة أسكوربات . هذا ، و يفرز الفيتامين فى البول فى صورة أسكوربات و dehydroascorbate ويهدم إلى أكسالات .

تفاعلاته :

حمض الأسكوربيك ثابت فقط فى الوسط الحامضى والوسط المختزل ، ولكنه يتأثر بدرجة كبيرة (غير ثابت) بالحرارة والقلويات والعوامل المؤكسدة والضوء . وهو يذوب فى الماء وتأثيره حمضى (pH = ٣) ، ويعتبر عاملاً مختزلاً ويكون ملح مع القواعد مثل أملاح الصوديوم والكالسيوم والعناصر الأخرى .

الذوبان : -

يعتبر فيتامين جـ من أكثر الفيتامينات ذوباناً فى الماء . حيث تصل نسبة ذوبانه إلى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣٠ جم / ١٠٠ مل . ويذوب بقلة فى الأسيتون والكحول ، وغير ذائب تماماً فى المذيبات الغير قطبية .

صوره وخواصه :

الصورة النقية عبارة عن مسحوق أبيض ، والصورة البللورية أبرية أو على شكل رقائق plates ، والوزن الجزيئى = ١٧٦,١٢ ، ويتلف قبل أن ينصهر على ١٩٠ - ١٩٢° ، وأقصى امتصاص له على طول موجة nm٢٤٥ (فى وسط حمضى) وعلى طول موجة nm٢٦٥ (فى وسط متعادل) . وله جهد أكسدة وأختزال يساوى + ٠,١٦٦ فولت (على p^H =٤) وله ثابتين انقسام الأول pK_{a1} = ٤,١٧ ، والثانى pK_{a2} = ١١,٥٧.

انتشاره ومصادره :

١ - **فى النباتات** : - ينتشر بكثرة وبتركيزات عالية فى النباتات ، فيوجد فى الفواكه وفى الفراولة والحمضيات (الموالح) والجوافة والكريز وغيرها . وفى الخضر يوجد فى الكرنب والطماطم والفجل والذرة والبقدونس .

٢ - **فى الحيوانات** : - يوجد تقريباً فى كل الحيوانات ولكن يختلف تركيزه من عضو إلى عضو آخر وتركيزه فى القرنية › الغده النخامية › Adrenal cortex › Thymus › الكبد › المخ › الخصية › المبيض › الطحال › الغدة الدرقية › البنكرياس › الغدد اللعابية › الرئة › الكلى › الأمعاء الدقيقة › القلب › العضلات › كرات الدم البيضاء WBC › كرات الدم الحمراء RBC › البلازما .

٣ - **فى الكائنات الحية الدقيقة** : - لا تستطيع البكتريا المعوية تخليقه ، ما عدا البكتريا المعوية للفئران . وينتجه عديد من الفطريات . وتحتاج إليه البكتريا والخميرة والفطريات لعملية التضاعف multiplication .

المصادر الغذائية :

١ - **المصادر الغنية** : - (من ١٠٠ إلى ٢٠٠ ملجم / ١٠٠ جم) فى الفجل والفلفل والبقدونس والكرنب المسلوق والجوافة والعنب الأسود .

٢ - **المصادر المتوسطة** : - (من ٥٠ إلى ١٠٠ ملجم / ١٠٠جم) فى الكرنب والمسطردة والسبانخ والليمون والبرتقال والفراولة .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٣ - **المصادر القليلة** : - (من ٢٥ الى ٥٠ ملجم / ١٠٠ جم) في الفول الأخضر والحمص والبصل والبطاطس وفول الصويا والبنجر الأخضر والجريب فروت والمانجو والكنتالوب والطماطم .

الدور الغذائي والطبي : -

١- **وحدات فيتامين جـ** : -وحدة دولية واحدة IU = وحدةUSP واحدة

= ٠,٠٠٥ ملجم حمض أسكوربيك

هذا ، وعادة ما يحسب تركيزه بالوحدات الوزنية (ملجم) .

٢ - **المستويات الطبيعية في الدم** : - ٠,٥ - ١ ملجم ٪ في البلازما ، ٢٥ ملجم ٪ في كرات الدم البيضاء WBC . وتختلف تبعاً لنوع الغذاء .

٣ - **المقررات الموصى بها** : - للأطفال يوصى بـ ٤٠ ملجم / يوم ، وللبالغين ٦٠ ملجم / يوم للذكور و٥٥ ملجم / يوم للإناث . وفي الحالات الخاصة تزيد إلى ٦٠ ملجم / يوم في الحمل والرضاعة ، وتزيد عن ذلك في حالات العدوى والإجهاد stress والتقدم في السن وفي حالة زيادة استهلاك البروتين وفي حالات الحساسية allergies والجروح trauma . وأحسن طريق لإعطاءه هو الفم ويمكن إعطاءه بالحقن في العضل أو في الوريد .

٤ - أعراض النقص : -

أ - **الأعراض العامة** : - ظهور بثرات ذات كيراتين عالي على الأرداف والسيقان، وأديما edema ، و نزيف دموي ، و عجز أو قصور في إلتأم الجروح ، و عيوب في الأسنان واللثة ، و ضعف وهزال و كسل ، و تخشن الجلد ، و الآم في المفاصل ، و تكوين عظام مصابة بالحفر (أسقربوطيةscarbutic) .

ب - **في الحيوانات المعملية** : - أنيميا ، و فقد الوزن، وتخليق كولاجين غير طبيعي ، وعدم تكوين المادة الأسمنتية اللاصقة بين الخلايا .

٥- **أمراض النقص** : - الأسقربوط scurvy (تورم اللثة ونزف الدم منها) و ظهور أنيميا megaloblastic في الأطفال .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٦ – مصادره للأجناس التى تحتاج إليه : –

معظم الأجناس تحتاج إليه ، ومعظمها أيضاً تخلقه .

أ – **المصادر الخارجية** : – كل من الحيوانات الرئيسية primates (وهى تضم الإنسان) وخنزير غينيا وخفاش الفاكهة الهندى والبلبل الأحمر والثاقبات والخميرة ، كلها تحتاج إليه من مصادر خارجية .

ب – **المصادر الداخلية** : – باقى الفقاريات التى لم تذكر سابقاً واللافقاريات والنباتات وبعض الفطريات والبكتريا يمكنها تخليقه بداخلها ولا تحتاج إليه من مصدر خارجى .

٧ – تأثير الجرعات العالية : –

لم تلاحظ أعراض جانبية نتيجة تناوله بكميات كبيرة فهو غير سام للإنسان ، ومن المحتمل أن يكون حصوات فى الكلى ، وله تأثير مثبط على مستوى الخلية (يثبط الأنقسام الميتوزى) . ربما يكون لحمض الديهيدوأسكوربيك dehydroascorbic acid تأثيراً مدمراً على الخلايا بيتا فى البنكرياس ، فيقل انتاج الأنسولين .

تحليل حمض الأسكوربيك

الفصل :

طرق تقدير وفصل حامض الأسكوربيك من النباتات والأنسجة الحيوانية والأغذية تتضمن الاستخلاص والتخلص من المواد المتداخلة clean up ، وأخيراً فصل أو تحليل الفيتامين فى المحلول . وكل من المذيبات المائية وغير المائية تستخدم فى الاستخلاص ، ففى حالة المستخلصات المائية فلابد من أخذ الاحتياطات الكافية حتى لا يحدث تحليل مائى وأكسدة مما يعقبهما فقد للفيتامين خصوصاعند وجود كميات صغيرة من الفيتامين فى العينة ، وأنسب المستخلصات المائية هى : –

١ – ٣ – ٦ ٪ حمض ميتافوسفوريك يحتوى على حمض خليك و EDTA .

٢ – ٠,٥ – ٢ حمض أكساليك .

٣ – محلول ثلاثى كلورو حمض الخليك TCA مع EDTA .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٤ – حمض بيركلوريك perchloric acid مخفف .

٥ – ٠,٥ ٪ محلول 2,3- dimercaptopropanol .

ومن أهم مميزات حمض الميتافوسفوريك و TCA انهما يعملان على تقليل أكسدة حمض الأسكوربيك لأقل درجة ممكنة وذلك من خلال ترسيبهما لأيونات المعادن التى تعمل كعامل مساعد فى الأكسدة . ومن ناحية أخرى ، فهما يرسبا البروتين وبذلك يصبح المحلول رائقاً . ويضاف حامض الخليك إلى المستخلص حتى يمنع فقد الفيتامين من الادمصاص على الفحم الحيوانى .

والمذيبات الغير مائية المستخدمة فى استخلاص فيتامين جـ من العينات المختلفة هى الأيثانول أو الميثانول ، وعادة ما يحتويان على آثار من حمض الميتافوسفوريك أو حمض أكساليك أو مادة مانعة للأكسدة مثل كلوريد القصديروز . وقد استخدم مخلوط من البنزين و dimethylformamide مع حمض سكسينيك للاستخلاص أيضاً . وبعض الطرق تضمنت أستخدام الأسيتون فى الأستخلاص للتخلص من ثانى أكسيد الكربون الموجود فى الأغذية والذى يتداخل مع فيتامين جـ .

لابد أن تتم عملية الاستخلاص بسرعة بعيداً عن الضوء وتحت غاز خامل قدر الامكان لتلافى التأثير الضار للضوء وللأكسجين خصوصاً عندما تكون كمية الفيتامين صغيرة . ثم ترويق المستخلص والتخلص من الشوائب فيه ، وهذا يعتمد على طبيعة المواد المتداخلة الموجودة فى العينة وعلى نوع المحلول . وعادة ما تتم هذه العملية بأستعمال الكربون للتخلص من اللون decolorization أو بالأعمدة الكروماتوجرافية والاستخلاص بمذيب يحتوى على كلوريد الميثيلين للتخلص من المواد المتداخلة . وأحسن الغازات الخاملة التى تم أستخدامها لحماية الفيتامين فى المحلول قبل التقديرأو الفصل هى الهيدروجين وكبريتيد الهيدروجين . والغاز الأخير طبق بنجاح عن غاز ثانى أكسيد الكربون أو النيتروجين .

ومن أحسن المصادر المستخدمة لفصل فيتامين جـ هى عصائر الحمضيات و adrenal cortex . هذا ويتم ترسيب فيتامين جـ من المستخلصات الرائقة فى صورة معقد مع الرصاص ثم يبللور من مخلوط كحول و إيثير بترولى .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

طرق التقدير :

١ – **الطرق الحيوية** : – أول تقدير حيوى لفيتامين جـ أعتمد على الوقاية من مرض الأسقربوط (اختبار الـ prophylactic test) أو علاجه (أختبار علاجى curative test) فى خنازير غينيا . وهذه الطرق تستهلك وقتاً طويلاً ، وتتطلب حوالى ١٠ أسابيع للوصول إلى تمام استنزاف الفيتامين .

وقد تم استبدالها بالطرق الأخرى (الكيميائية والكميائية الطبيعية والكروماتوجرافية) والتى تتميز بسرعتها وقلة تكاليفها . ولكن مازالت تستخدم الطرق الحيوية لأغراض المقارنة مع الطرق الأخرى . وحتى اليوم لم تكتشف طريقة ميكروبيولوجية بسيطة لتقديره ، ويرجع ذلك إلى عدم وجود الميكروب الذى يتطلب فيتامين جـ بصورة مطلقة .

٢ – **الطرق الكيميائية** : – أول تقدير كيميائى لفيتامين جـ كان بالمعايرة التأكسدية مع صبغة ٦،٢ ثنائى كلوروفينول أندوفينول (DCPIP) وقد أدخل عليها تعديلات عديدة ، ومازالت تستعمل حتى الآن بكفاءة عالية . وتستعمل العوامل المؤكسدة التالية فى تقديره ، وهى N-bromosuccinamide , pot. hexacyanoferrate III , Iodine . chloramine, 1,2-dinaphthoquinone -1- sulfonic acid, methylene blue .

ويعاب على هذه المواد عدم تخصصها ، وتتداخل المواد المختزلة الأخرى الموجودة فى الأغذية والمنتجات الطبيعية فى التقدير مثل ثانى أكسيد الكبريت والأحماض الأمينية وأيونات والمعادن الصبغات النباتية والكيتونات المختزلة reductones . لذا يجب التخلص هذه المواد المتداخله قبل التقدير . وتتضمن الطرق النموذجية للتخلص من ثانى أكسيد الكبريت معاملة العينة بالنيتروجين أو أسيتون أولاً ، وترسيب الأحماض الأمينية والبروتينات والأيونات المعدنية. وتستعمل الطرق الكهربية electrometric methods لتلافى تأثير الكيتونات المختزلة.
ويتم ربط الأحماض الأمينية الكبريتية (تتداخل فى المعايرة بواسطة o-iodobenzoate) بعملية cyanoethylation . وتفضل هذه الطريقة لتقدير فيتامين جـ فى المستحضرات الطبية والأغذية والسوائل الحيويه . كما تستخدم بعض الطرق (kits) أحد مشتقات التترازوليم كعامل مؤكسد ، ويحدث فيها أيضاً بعض التداخلات ، ولكن يقدر البلانك فيها بتحضين العينة مع أنزيم L-ascorbate oxidase والفرق بينهما يعبر عن كمية فيتامين جـ الفعلى . وقد أستخدمت طريقة لونية لتقدير الفيتامين حيث تعتمد على تكثيف حمض الأسكوربيك مع

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

أحد مشتقات النيتروأنيلين أو مع معقد من أيونات الحديدوز وأحد مشتقات الترای آزين triazine فتتكون نواتج ملونة يمكن قياسها بجهاز قياس الألوان ، وتم تطوير هذه الطريقة بحيث تطبق أتوماتيكياً (آلياً) لتحليل فيتامين جـ فى المستحضرات الطبية والأغذية .

٣ - الطرق الأسبسكتروفوتومترية : -

حيث أن حمض الأسكوربيك نفسه يمتص الموجات فوق البنفسجيةUV بقوة ، وعليه قد تم تقديره سبكتروفوتومتريا مباشرة وبعد استخلاصه بصورة نقية من المشروبات والفواكه والمستخلصات النباتية . ولكن يقاس امتصاص نفس العينة قبل وبعد التحضين مع أنزيم L-ascorbate oxidase ، والفرق بينهما يعبر عن كمية الفيتامين .

٤ - طرق ضوئية (فوتومترية) : -

تعتمد هذه الطريقة على تكوين لون مع (2,4-dinitrophenylhyrazine (DNPH باكسدة حمض الأسكوربيك إلى حمض ديهيدرو أسكوربيك ثم تحليله مائياً إلى - 2,3 L-gulonic dioxoacid والذى يتفاعل مع DNPH ويتكون dinitrophenlylhydrazone ذو لون أحمر (شكل ٣٥). وتتداخل فى هذا التقدير أيضاً السكرات الخماسية والسداسية وحمض الجلوكيورنيك والـ reductone والأحماض الامينية .

٥ - طرق كهربية : -

استخدم حديثاً طريقة كهربية سريعة لتقدير فيتامين جـ مباشرة تعتمد على أكسدتة بالهواء الجوى إلى حمض ديهيدرو أسكوربيك والذى يقاس باستعمال chronoamperometry . واستخدم وأنزيم L-ascorbate oxidase لتصحيح المواد المتداخلة. وهذا ، وقد حضرت أقطاب مختارة تحتوى على أنزيم L-ascorbate oxidase ، فهذه الأقطاب الأنزيمية حساسة فقط لحمض الأسكوربيك ولا تستجيب لأى مادة متداخلة أخرى ، وهذه أدق طريقة استخدمت بدون أى تداخل يذكر .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

Ascorbic acid — Mild oxidation → Dehydroascorbic acid + 2 (2,4-dinitrophenylhydrazine) — Strong acid → Bis-2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid

The dinitrophenylhydrazine reaction for vitamin C.

شكل (٢٥) تفاعل DNPH مع حمض الاسكوربيك

٦ - الطرق الكروماتوجرافية : -

طبق تكنيك الـ HPLC و GC فى تقدير حمض الأسكوربيك فى المواد الحيوية ، وأيضاً لهذه الطرق أهميتها الخاصة فى التقدير من حيث الدقة وعدم تداخل المواد فى التقدير .

تقدير الأسكوربات فى البول بالمعايرة بصبغة DCPIP (Harris and Ray , 1935)

كما سبق القول أنه مازالت تستخدم طريقة المعايرة بصبغة DCPIP لتقدير فيتامين جـ حتى الآن ، وهى تعتمد على الخواص الاختزالية للفيتامين والخواص التأكسدية للصبغة . وتعتبر هذه المعايرة بطبيعة الحال معايرة أكسدة واختزال redox titration ، فمعايرة محلول الصبغة بواسطة محلول حمض الأسكوربيك فى الوسط الحمضى يؤدى إلى اختزال اللون الأزرق للصبغة وتتحول إلى الصورة المختزلة عديمة اللون colorless leucobase ، بينما تتأكسد الأسكوربات متحولة إلى dehydroascorbate . ويمكن تقدير الأخير باختزاله أولاً إلى أسكوربات فى الوسط الحامضى بواسطة hydrogen sulphide . ومن ناحية أخرى فإن

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المواد المختزلة التى ربما قد توجد مصاحبة للأسكوربات ، خصوصاً فى البول ، تتفاعل مع الصبغة ، وعلى ذلك فإنها تؤثر على كفاءة الطريقة ودقتها .

الجواهر الكشافة : -

١ - حمض خليك ثلجى .

٢ - محلول صبغة ٢,٦ ثنائى كلوروفينول أندوفينول DCPIP : - يوزن بالضبط ٤٠ ملجم من الصبغة ثم تذاب فى ١٠٠ مل ماء مقطر (١ مل من محلول هذه الصبغة يكافىء ٠,٢ ملجم حمض أسكوربيك) . وحيث أن هذا المحلول يتلف بسرعة (لا يستعمل بعد تخزينه لمدة أكثر من أسبوع) ، لذلك لابد من استعمال محلول حديث التحضير أو تضبط قوته بالمعايرة بمحلول قياسى من حمض الأسكوربيك. ويتم ذلك باذابة ٤٠ ملجم حمض أسكوربيك نقى جاف فى ١٠٠ مل حمض خليك ١٠ ٪ ثم يخفف ٥ مل منه إلى ١٠٠ مل بحمض الخليك ١٠ ٪ ، ويعاير ٠,٥ مل من الصبغة بهذا المحلول .

التكنيك : -

١ - يؤخذ ٠,٥ مل من محلول الصبغة فى أنبوبة اختبار (١٥ × ٢,٥ سم) ثم يضاف إليها ١,٠ مل حمض خليك ثلجى .

٢ - تجرى المعايرة بمحلول البول ببطء مع مراعاة الرج الثابت حتى يظهر اللون الأحمر للصبغة ، ثم يسجل حجم البول اللازم لهذه المعايرة .

الحساب : -

حيث أن ٠,٥ مل محلول صبغة (٤٠ ملجم / ١٠٠ مل) تتفاعل مع ٠,١ ملجم حمض أسكوربيك . ، فعلى ذلك يمكن حساب كمية الفيتامين فى البول من المعادلة التالية : -

$$\text{Urinary ascorbate (mg / 1)} = \frac{100}{\text{ml urine required}}$$

طريقة أخرى : -

وفى هذه الطريقة يخلط جزء من البول مع كمية من حمض الخليك الثلجى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مقدارها تُسع (١/٩) حجم عينة البول ، ثم يقدر الحجم اللازم منه لاختزال ٠,٥ مل من محلول الصبغة . وهذا يضمن تركيز متساوى من حمض الخليك ، وتحسب كمية الأسكوربات من المعادلة التالية : -

$$\text{Urinary ascorbate (mg /l)} = \frac{100}{\text{ml urine required}}$$

ملاحظات : -

١ - تتم عملية المعايرة بعينات طازجة (خلال بضع دقائق من بعد أخذ العينة) لأن الفيتامين يتأثر بالهواء الجوى ،كما وإن حالة البول عادة ما تكون حامضية (يفقد الفيتامين بسرعة) ، لذلك لابد من إضافة حمض الخليك لعينة البول مباشرة وبسرعة بعد أخذ العينة وبنسبة جزء حمض خليك إلى ٩ أجزاء من البول . وفى هذه الظروف يمكن حفظ العينة لعدة ساعات .

غالباً ما يتم هذا التقدير على عينات البول تم تجميعها كجزء من اختبارات التشبع، واختبار التشبع بحمض الأسكوربيك هو أحداها ، حيث تتم المعايرة فى الحال . وتضاف كمية كبيرة من حمض الخليك إلى البول لوقاية العينات لمدة ٢٤ ساعة ، ولكن تقدير حمض الأسكوربيك فى هذه الحالة يكون غير ملائم .

٢ - المواد الاختزالية الأخرى ، خصوصاً مركبات السلفهيدريل sulfhydryl ، والتى ربما قد توجد فى البول ، تتفاعل أبطء من حمض الأسكوربيك على درجة P^H = ٣ ، لذلك فهذه الطريقة تكون دقيقة بدرجة كافية لمعظم الأغراض الأكلينيكية . أما فى اختبارات التشبع، حيث توجد كمية كبيرة جداً من الأسكوربات ، فيكون تأثير هذه المواد المتداخلة قليل الأهمية لدرجة أنها تهمل .

التفسير : -

كمية الأسكوربات المفرزة (output) فى اليوم عادة ما تكون حوالى ٢٠ - ٣٠ ملجم ، وهى حوالى نصف المأخوذ يومياً . والحد الأدنى للمأخوذ يومياً والذى يلزم للوقاية من مرض الأسقربوط يبلغ حوالى ٦٠ ملجم . وفى حالات نقص الفيتامين ، غالباً ما تختفى الأسكوربات من البول ، والكميات الصغيرة المقدرة فى هذه الحالات ربما تعزى للمواد المختزلة الأخرى .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

وأخيراً ، كمية المفرز منه خلال ٢٤ ساعة ليس دليلاً جيداً لحالة نقص الفيتامين ، ولكن يلزم اجراء أختبار التشبع .

أختبارات تشبع حمض الأسكوربيك Ascorbic acid saturation tests

فى هذه الاختبارات يفترض ما يلى : - لو كانت كمية الفيتامين التى سبق تناولها غير كافية ، فإن الأنسجة سوف تأخذ كميات كبيرة جداً من حمض الأسكوربيك عند اعطاءه حين أجراء الأختبار ، لذلك فإنه تفرز كمية صغيرة منه فى البول أو ربما لا يفرز نهائياً (يأخذ بالكامل). أما فى حالة الأشخاص الذين يتناولون كميات كافية من الفيتامين ، فإن الكمية المفرزة فى البول نتيجة تناول حمض الأسكوربيك حين اجراء الاختبار تكون متناسبة مع كمية الفيتامين المعطاه . وفى هذا الأختبار تعطى جرعات مختلفة ومعلومة من الفيتامين إما عن طريق الفم orally أو بالحقن فى الوريد ثم تجمع عينات البول على فترات زمنية مختلفة ويقدر فيها الفيتامين .

التكنيك : -

١ - يعطى الشخص جرعة من حمض الأسكوربيك مقدارها ١١ ملجم فيتامين لكل كيلو جرام من وزن الجسم عن طريق الفم (متوسط وزن الجرعة للشخص البالغ يبلغ حوالى ٧٠٠ ملجم) . وتعطى هذه الجرعة فى الماء إما والشخص صائماً أو بعد ساعتين أو ثلاث ساعات من تناول الوجبة الغذائية .

٢ - تجمع فقط عينة بول بعد فترة زمنية قدرها ٤ - ٦ ساعات من تناول الجرعة عندما يكون الافراز أقصى ما يمكن maximal .

٣ - تقدر كمية الفيتامين فى البول ومنها تحسب كمية الفيتامين المحتبسه فى أنسجة الجسم .

ويمكن تقدير الاختبار كما يلى : -

١ - الساعة ١٠٠٠ تعطى جرعة فيتامين جـ مذابة فى حوالى ١٥٠ مل ماء .

٢ - الساعة ١٤٠٠ تفرغ المثانة بالكامل ويستبعد البول .

٣ - الساعة ١٦٠٠ تفرغ المثانة بالكامل ويقدر محتوى حمض الأسكوربيك فيها فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الحال كما سبق شرحه فى الطريقة السابقة . ويكرر الاختبار يومياً حتى نحصل على استجابة طبيعية .

التفسير : -

فى حالات تناول فيتامين جـ بصورة طبيعية لابد أن يكون الخارج منه حوالى ٥٠ ملجم فى اليوم الأول والثانى ، وفى حالات النقص المتوسطة ، نجد أن هذه القيمة تقل ، ولابد من أنقضاء ٦ - ١٠ أيام حتى نحصل على القيمة الطبيعية (٥٠ ملجم) ، أما فى حالات النقص الحاد ، ربما يلزم ١٤ - ٢١ يوم حتى نبلغ المستوى الطبيعى السابق ذكره .

فى حالات النقص ، النتائج تبين افراز ظاهرى يبلغ ٢ ملجم أسكوربات وهذه قيم خاطئة ترجع إلى المواد المختزلة الأخرى ، وتظل هذه القيمة ثابتة حتى تتعدل حالة النقص . ويزداد محتوى عينات البول من الأسكوربات يوم بعد يوم حتى يبلغ ٤٠ - ٥٠ ملجم (الكمية الموجودة فى الحالات الطبيعية) . وفى حالة عينات البول الغنية بالأسكوربات يجب تخفيفها من ٥ - ١٠ أضعاف بالماء المقطر قبل المعايرة حتى يقل الخطأ التجريبى .

هذا الاختبار أنتقد ، ولكنه من الناحية العملية يكون ملائماً وكافياً ، كما أن إى حالة نقص فى الأسكوربات تعالج أثناء اجراء الأختبار .

تقديرحمض الأسكوربيك فى البلازما بالمعايرة بوسط DCPIP (Varley,1988)

الجواهر الكشافة : -

١ - جوهر الترسيب : مخلوط ثلاثى كلوروحمض الخليك TCA (١٠٠ جم / لتر) وحمض ميتافوسفوريك (٥٠ جم / لتر) حديث التحضير .

٢ - محلول صبغة ٢ ، ٦ ثنائى كلوروفينول أندوفينول : - تحضر كما سبق ، ثم يخفف ٥ مل منه إلى ٢٥ مل ، وعليه فكل ١,٠ مل يكافىء ٤٠ ميكروجرام حمض أسكوربيك .

الطريقة : -

١ - يخلط حجمين متساوين من البلازما المفصولة بسرعة مع جوهر الترسيب (٤ مل من كل منهما) .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

٢ – يرشح المحلول الناتج ، أو يطرد مركزياً .

٣ – يؤخذ ٢,٠ مل من الصبغة المخففة فى أنبوبه أختبار وتعاير بالمحلول الرائق المتحصل عليه من البلازما حتى يختفى اللون الأزرق ويظهر لون محمر reddish

الحساب : –

حيث أن ٢٠٠ µl من محلول الصبغة يكافىء ٨ ميكروجرام أسكوربات ، فإنه يمكن تطبيق المعادلة التالية لنحصل على تركيز الأسكوربات فى البلازما : –

$$\text{Plasma ascorbate (mg / 1)} = \frac{16}{\text{ml titration}}$$

ملاحظات : –

١ – بالرغم من ان حمض الميتافوسفوريك له ميزة عن الـ TCA ، إلا أن صورته الصلبة غير ثابتة بمجرد فتح زجاجته ، ولكن ثبات الـ TCA يكون كافى ولأبعد الحدود .

٢ – يمكن تجميع عينات الدم فى هيبارين أو EDTA أو أكسالات ، ومن المستحسن فصل البلازما ومعايرتها بمجرد فصلها ، ولكن إذا دعت الضرورة تخزين البلازما ، فيمكن تخزين المحلول الرائق الخالى من البروتين لعدة ساعات على – ٢٠° م . ويمكن جمع ٤ – ٥ مل من الدم فى أنبوبه أختبار تحتوى نقطة واحدة من محلول سيانيد بوتاسيوم (٥٠ جم / لتر) ونقطة من محلول أكسالات بوتاسيوم (٢٠٠ جم / لتر) .

التفسير : –

مستويات الأسكوربات فى البلازما تكون محدودة (صغيرة جداً) فى حالات النقص الشديد من هذا الفيتامين . و مع تناول وجبة متزنة ، تكون مستويات الأسكوربات ٤ – ٢٠ ملجم / لتر ، وغالباً ما تكون ٨ – ١٤ ملجم / لتر . المستويات التى أقل من ٢ ملجم / لتر توحى بأنه توجد حالة نقص ملحوظة . وتختفى الأسكوربات من البلازما بسرعة أكبر عما يحدث فى الخلايا عندما تحتوى الوجبات الغذائية على كميات صغيرة من فيتامين جـ ، وخلايا الدم البيضاء هى آخر خلايا يظهر فيها هذا النقص ، وعلى ذلك فإن تقديره فى كرات الدم

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

البيضاء يستخدم كأفضل دلالة على النقص الحاد فى هذا الفيتامين . ويتباين تركيز الأسكوربات تبايناً كبيراً باختلاف كمية ما يتناوله الشخص من الموالح ، فالأشخاص الذين يتناولون كميات كبيرة منها يزيد تركيز الأسكوربات فى دمهم عن غيرهم من الناس الذين يتناولون طعاماً أقل فى محتواه من حمض الاسكوربيك .

وتركيز حمض الاسكوربيك فى البلازما يعتبر دليلاً كافياً موثوقاً به للحالة الغذائية فيما يختص بفيتامين جـ (دلالة على حالته هل هى طبيعية أم هناك نقص) ولكن بعض الباحثين يفضل إجراء اختبار التشبع لتحديد هذه الحالة .

تقدير حمض الأسكوربيك فى الأنسجة النباتية بطريقة DCPIP

(Schanderl , 1970)

تعتمد هذه الطريقة على تفاعل حمض الأسكوربيك مع صبغة DCPIP والتى تختزل إلى مركب غير ملون ، وهذا التفاعل يسير بنسبة مكافىء لمكافىء stoichimetric ، وتتم المعايرة فى وسط حامضى لتلافى الأكسدة الهوائية (والتى تتم بمساعد الأيونات المعدنية)، ولوقف نشاط الأنزيمات ولترسيب البروتينات وتحرير حمض الأسكوربيك المرتبط بالبروتين . وقد عدلت هذه الطريقة على أساس لونى حيث تضاف كمية زائدة من الصبغة ثم يقاس الجزء الغير متفاعل منها لونياً . ومن أهم مميزات الطريقة المعدلة هو استخلاص الصبغة الزائدة بالزيلين عند وجود صبغات نباتية أو عكارة فى العينة تتداخل مع التقدير .

الجواهر الكشافة : -

١ - **محلول حمض ميتافوسفوريك - خليك** : - يذاب ١٥ جم حمض ميتا فوسفوريك فى مخلوط يحتوى على ٤٠ مل حمض خليك ثلجى و ٤٠ مل ماء، ثم يرشح المحلول ويخزن فى الثلاجة . يتلف هذا المحلول بعد ١٠ أيام .

٢ - **محلول صبغة DCPIP قياسى** : - يذاب ٤٢ ملجم بيكربونات صوديوم و ٥٢ ملجم صبغة DCPIP فى ٥٠ مل مـاء ، ثم يخفف إلى ٢٠٠ مل . ترشح وتخزن فى الثلاجة لمدة لاتزيد عن ٣ أيام . ولضبط قوتها يذاب ١٠٠ ملجم حمض أسكوربيك نقى فى ١٠٠ مل محلول حمض ميتا فوسفوريك - خليك ، ويؤخذ ١٠ مل منه وتخفف بـ ٢٥ مل من حمض ميتافوسفوريك - خليك ، وتعاير بمحلول

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

الصبغة حتى اللون الوردى الخفيف pink الذى يثبت لمدة ٥ ثوان . تقدر من هذه المعايرة قوة محلول الصبغة ، ويعاد ضبط قوة الصبغة كل يوم بمحلول حمض أسكوربيك قياسى حديث التحضير .

الطريقة : -

١ - يجهز وزن معلوم من العينة النباتية بحيث يحتوى على ٥ - ٥٠ ملجم حمض أسكوربيك مع ١٥٠ مل من محلول حمض ميتافوسفوريك ، خليك فى خلاط ، ثم يخفف إلى ٢٠٠ مل بالضبط ويرشح .

٢ - يعاير حجم معلوم من الراشح الناتج (١٠ - ١٠٠ مل) مع محلول الصبغة القياسى حتى اللون الوردى الخفيف .

الحساب : -

عدد ملجرامات حمض الاسكوربيك لكل حجم عينة = D × S × V

حيث أن :-

V = عدد ملليترات الصبغة المستخدمة فى المعايرة .

S = تركيز الصبغة معبراً عنه بملجم حمض الأسكوربيك / مل .

D = عامل التخفيف .

تقدير حمض الاسكوربيك في خلايا الدم البيضاء

(Gibson et al. , 1966)

حتى يمكن إجراء هذا التقدير لابد أولاً فصل كرات الدم البيضاء من الدم ، ثم يقدر بعد ذلك محتواها من الفيتامين . يخفف الدم مباشرة بعد أخذه بمحلول تخفيف فسيولوجى يتركب من كلوريد صوديوم ٠,٨٥ ٪ و EDTA كعامل مانع للتجلط و دكستران dextran الذى يعمل على تكوين غلاف حول كرات الدم الحمراء (يغلفها rouleaux) ، وهذا بدوره يؤدى إلى زيادة وزنها فترسب بسرعة عند تركها فترة فى القاع بتأثير الجاذبية الأرضية . أما كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية فتبقى معلقة supend فى البلازما والتى يمكن فصلها بسهولة عن طريق الطرد المركزى ، ثم يتم تقدير الأسكوربات فيها بالاستخلاص أولاً بمحلول

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ثلاثى كلورو حمض الخليك TCA (يرسب كل البروتينات) ، ثم تقاس الأسكوربات بطريقة 2,4 - dinitrophenylhdrazone (DNPH) .

الجواهر الكشافة : –

١ – محلول التخفيف : – يخلط ٢٠٠ مل من محلول NaCl (٠,٨٥ ٪) و ٥٠ مل من محلول دكستران (٦٠ جم / لتر) و٢ مل من محلول EDTA (ملح ثنائى الصوديوم ، ١٠٠ جم / لتر) معاً جيداً ، ثم تؤخذ منها حجوم متساوية مقدارها ١٢,٥ مل فى أوعية خاصة بغطاء screw-cap ، وتعقم فى الأوتوكلاف على ضغط 5 psi (35 Kpa) لمدة ١٥ ق .

٢ – محلول ثلاثى كلورو حمض الخليك TCA (٥٠ جم / لتر) .

٣ – جوهر اللون colour reagent : – تخلط المحاليل التالية بهذه النسب ٢٠ : ١ : ١ كما يلى : –

أ – محلول DNPH : – ٢٢ جم / لتر من حمض كبريتيك ١٠ mol / لتر .

ب – محلول ثيويوريا thiourea : – ٥٠ جم / لتر ماء .

جـ – محلول كبريتات نحاس : – ٦ جم $Cu\ SO_4 .\ 5H_2O$ / لتر ماء .

٤ – محلول حمض كبريتيك : – يضاف ٦٥٠ مل حمض كبريتيك مركز إلى ٣٥٠ مل ماء مقطر .

٥ – محلول حمض أسكوربيك قياسى : – ١٠ ملجم حمض أسكوربيك نقى تذاب فى لتر من الجوهر رقم ٢ .

التكنيك : –

١ – تؤخذ عينة دم وريدى مقدارها ٦ – ١٠ مل ثم تضاف بسرعة وفى الحال إلى وعاء التخفيف المعقم السابق تحضيره .

٢ – تخلط المحتويات جيداً وتترك فى وضع أفقى لمدة ٣٠ ق حتى ترسب كرات الدم الحمراء قبل إزالة المحلول الرائق .

٣ – يؤخذ المحلول الرائق ثم يطرد مركزياً على ٢٠٠٠ rpm لمدة ١٥ ق ، ويهمل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الرائق ، ثم يسمح للأنبوبة بأن يخرج منها ما تبقى من محلول رائق لمدة ٣٠ ثانية. وبذلك نحصل على رواسب كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية .

٤ – يضاف ١,٣ مل جوهر TCA ، ثم تخلط جيداً وتطرد مركزياً ، ويؤخذ من المحلول الرائق ١,٠ مل إلى أنبوبة اختبار صغيرة .

٥ – فى أنابيب اختبار أخرى يوضع ما يلى : –

أ – ١,٠مل محلول TCA (بلانك) .

ب – ٠,٥ مل محلول TCA و ٠,٥ محلول حمض أسكوربيك قياسى (S_1) .

جـ – ١,٠ مل محلول حمض أسكوربيك قياسى (S_2) .

٦ – يضاف إلى كل الأنابيب ٠,٣ مل جوهر اللون ثم تحضن فى حمام مائى على٣٧°م لمدة ٤ ساعات ، ثم تبرد فى ماء مثلج .

٧ – يضاف ٢,٠ مل محلول حمض كبريتيك ببطء لكل أنبوبة ، ثم تخلط المحتويات ويقاس امتصاص اللون على طول موجة ٥٢٠ nm ضد البلانك .

٨ – تعد كرات الدم البيضاء فى الباقى من معلق كرات الدم البيضاء الأصلى باستعمال تخفيف ١ إلى ٥٠ فى coulter counter مع مراعاة طرح الـ background blank .

هذا، ومن المفضل إجراء التقديرات الكيميائية والسيتولوجية cytological مرتين duplicate .

الحساب : –

يمكن حساب محتوى الأسكوربات فى المحلول الرائق من هذه المعادلة :

$$\text{Supernant ascorbate content (mg/1)} \frac{\text{Read of unknown}}{\text{Read of standard}} \times 5 \text{ or } 10$$

وهذا العامل المستخدم يعتمد على حجم المحلول القياسى المستخدم ، وهو يساوى 5 فى حالة (S_1) ويساوى 10 فى حالة (S_2)

لو لزم الأمر يمكن إجراء منحنى خطى قياسى باستعمال حجوم أخرى ومختلفة من المحلول القياسى وتكمل كل منها إلى ١,٠ مل بمحلول الـ TCA .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ويمكن نسب هذا التقدير إلى عدد كرات الدم البيضاء بتطبق هذه المعادلة :-

Buffy layer (leucocyte + platlet) ascarbate (µg / $_{10}8$ leucocytes) =

$$\frac{\text{Supernatant as corbate (mg /l)} \times 1.3}{\text{Leucocyte Count / µl supernatant}}$$

التفسير : -

تركيز الأسكوربات فى كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية يكون مماثلاً لما هو فى الدم الطبيعى ، فلو كان الرقم فى كلاهما غير طبيعى (شاذ) ، فالطريقة المتبعة تعطى تقديراً خادعاً لتركيز الأسكوربات فى خلايا الدم البيضاء ، ويمكن حساب هذا التركيز الصحيح من نتائج الـ buffy بالقسمة على ٢,٠ لو كان عدد كرات الدم البيضاء والصفائح الدموية طبيعى . وفى حالة thrombocytopenia مع عدد كرات دم بيضاء طبيعى، فإن العامل يقل ويصبح ١,٣ وهذا الرقم ربما يستخدم فى حالة الـ relative thrombocytopenia ، عندما يزداد عدد كرات الدم البيضاء ولا يكون هناك تناسب بينها وبين الصفائح الدموية . وفى حالات الـ thrambocythaemic سواء المطلقة absolute أو النسبية relative فإن هذا العامل يصبح ٣,٠٠.

المدى الطبيعى والذى يرجع اليه لـ buffy layer هو ٢١ - ٥٧ ميكروجرام لكل ١٠^٨ خليه دم بيضاء ولكرات الدم البيضاء فقط هو١١ - ٢١ ميكروجرام لكل ١٠^٨ خليه دم بيضاء

تقدير فيتامين جـ فى المستحضرات الصيدلية بطريقة

U.S. Pharmacopeia (1985)

فى هذه المستحضرات يكون تركيز فيتامين جـ كبيراً جداً . وتحت هذه الظروف يمكن تقديره بالمعايرة بمحلول يود قياسى فى وجود دليل مناسب (دليل النشا) . حيث يتفاعل كل منهما مع الآخر تفاعل أكسدة واختزال ، فيقوم اليود بأكسدة حمض الأسكوربيك إلى حمض ديهيدرو أسكوربيك ويختزل اليود إلى آيون يوديد مع مراعاة إجراء التفاعل فى ظروف حامضية وخالية من غاز ثانى أكسيد الكربون .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول يود فى يوديد بوتاسيوم (٠,١ N) .

٢ - محلول حمض كبريتيك (٢ N) .

٣ - محلول دليل النشا (١٪) .

التكنيك : -

١ - يوزن حوالى ٤٠٠ ملجم مستحضر حمض الأسكوربيك بالضبط ثم يذاب فى مخلوط مكون من ١٠٠ ماء خالي من CO_2 و ٢٥ مل محلول حمض الكبريتيك (يمكن التقدير فى المستحضرات السائلة بتعديل الطريقة تعديلاً بسيطاً حتى يتلائم مع ظروف التقدير) .

٢ - يعاير المخلوط فى الحال بمحلول اليود القياسى حتى أول نقطة تعطى لون أصفر و يختفى بالتقليب .

٣ - يضاف ٣ مل محلول دليل النشا كدليل لتحديد نقطة النهاية ثم تكمل المعايرة حتى أول نقطة يتلون عندها المحلول باللون الأزرق ، ثم تؤخذ قراءة السحاحة .

الحساب : -

يحسب تركيز حمض الأسكوبيك على أساس أن : -

كل ١,٠ مل محلول يود قياس قوته ٠,١ N تكافىء ٨,٨٠٦ ملجم فيتامين جـ .

تقدير حمض الأسكوربيك فى البلازما بطريقة DNPH

تستخدم هذه الطريقة بكثرة لتقدير حمض الأسكوربيك فى البلازما أو السوائل الحيوية الأخرى . وفى هذه الطريقة يتفاعل حمض الأسكوربيك معDNPH بعد أكسده الفيتامين إلى dehydroascorbic acid (شكل ٣٥) . وهذه الطريقة لايمكنها التمييز بين الصورتين النشطتين حيوياً وبين المركب الغير نشط حيوياً وهو diketogulonic acid . وتتضمن الطريقة أكسده حمض الأسكوربيك الى dehydroascorbic acid إما بواسطة كبريتات نحاس أو بواسطه صبغة DCPIP .

الـ dehydoascarbic acid فى محلول الحمض القوى يتفاعل مع DNPH مكوناً

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مشتق dinitrophenylhdrazone ، وهذا المشتق فى وجود محلول حمض الكبريتيك يعطى لوناً أحمراً والذى يمكن قياسه على طول موجة ٥٢٠ nm فى وجود بلانك . وتضاف الثيويوريا إلى جوهر DNPH لمنع أكسدة الجوهر (DNPH) عن طريق المواد المتداخلة . وحيث أن عينات الدم تحتوى على كميات صغيرة جداً من dehydroasrbic acid أو diketogulonic acid ، فإن كل من طريقة الـ DNPH وطريقة DCPIP يعطيا نفس النتائج .

الطريقة الأولى (Nino and Shaw ,1982)

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول حمض ميتافوسفوريك metaphosphoric acid (٦٠ جم / لتر) : - يذاب ٣٠,٠ جم من حمض metaphosphoric acid (HPO_3) فى ماء مقطر ويكمل الحجم الى ٥٠٠ مل . يحضر هذا المحلول قبل الاستعمال مباشرة (يستخدم حديث التحضير) .

٢ - محلول حمض كبريتيك (٤,٥ M) : - يضاف ببطء ٢٥٠ مل من حمض الكبريتيك المركز (AR) إلى ٥٠٠ مل ماء مقطر بارد فى دورق لتر ، ثم يترك ليبرد ويكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر .

تحذير : - حيث أن هناك كمية حرارة كبيرة تتكون عند تخفيف حمض الكبريتيك المركز ، فلابد من وضع الدورق فى حمام ثلجى ويضاف الحمض المركز ببطء شديد مع مرعاه خلط المحلول باستمرار بعد كل إضافة .

٣ - محلول حمض كبريتيك (١٢ M) : يضاف ٦٥٠ مل حمض كبريتيك مركز (AR) إلى ٣٠٠ مل ماء مقطر ثم يكمل إلى لتر بالماء المقطر ، ويراعى تحضيره مثل الجوهر رقم (٢) .

٤ - جوهر DNPH (٢٠ جم فى لتر حمض كبريتيك ٤,٥ M): - يذاب ١٠ جم من 2,4-dinitrophenylhydrazine فى قليل من جوهر رقم (٢) ، ثم يكمل بنفس المحلول إلى ٥٠٠ مل ، ثم يترك المحلول فى الثلاجة طوال الليل ، يرشح بعد ذلك.

٥ - محلول الثيويوريا (٥٠ جم / لتر) : - يذاب ٥ جم من الثيويوريا فى قليل من ماء مقطر بجهاز تقطير زجاجى ، ثم يكمل المحلول إلى ١٠٠ مل بنفس الماء المقطر.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

هذا المحلول ثابت لمده شهر على ٤ ° م .

٦ - محلول كبريتات نحاس (٦ جم / لتر) :- يذاب ٠,٦ جم من كبريتات النحاس اللامائية فى ماء مقطر بجهاز تقطير زجاجى ، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل .

٧ - جوهر DNPH - thiourea - $CuSO_4$ (DTCS) : - يضاف ٥ مل من محلول الثيويوريا و ٥ مل من محلول كبريتات النحاس إلى ١٠٠ مل من محلول DNPH ، ثم يخزن فى زجاجة على ٤°م لمدة أقصاها أسبوع واحد .

٨ - المحاليل القياسية : - جميع محاليل حمض الأسكوربيك القياسية لابد من تحضيرها طازجة يوم بيوم.

أ - Ascorbic acid stock standard (٥٠٠ ملجم / لتر) : - يذاب ٥ ملجم حمض أسكوربيك نقى فى قليل من جوهر رقم (١) ، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل .

ب -.Intermediate ascorbic acid standard (٥٠ ملجم / لتر) : - يؤخذ ١٠,٠ مل من محلول رقم (٨ - أ) وتوضع فى دورق معيارى ١٠٠ مل ، ويكمل إلى العلامة بمحلول رقم (١) .

حـ - Working standards : - فى عدة دوارق معيارية سعه ٢٥ مل ، توضع الحجوم التالية من محلول (٨ - ب) : - ٠,٥ و ٢,٠ و٤,٠ و٦,٠ و ١٠,٠ و ١٥,٠ و ٢٠,٠ مل ، ثم يكمل كل منها إلى العلامة (٢٥ مل) بواسطة الجوهر رقم (١). وبذلك نحصل على محاليل قياسية بالتركيزات التالية : - ٠,١٠ و٠,٤٠ و٠,٨٠ و ١,٢٠ و٢,٠٠ و٣,٠٠ و٤,٠٠ ملجم / ١٠٠ مل ، على التوالى .

التكنيك : -

١ - يضاف ٠,٥ مل من البلازما المعاملة بالهيبارين heparinized plasma إلى ٢,٠ مل من جوهر رقم (١) حديث التحضير فى أنبوبة اختبار ١٣ × ١٠٠ مم ، ثم تخلط جيداً باستعمال vortex mixer . يتم الطرد المركزى للمخلوط على ٢٥٠٠ rpm لمدة ١٠ ق ، ثم يؤخذ من المحلول الرائق حجم مقداره ١,٢ مل فى أنبوبة اختبار بغطاء حلزونى (١٣ × ١٠٠ مم) .

٢ - يؤخذ حجم مقداره ١,٢من جميع المحليل القياسية (٨ - حـ) وتوضع فى سلسلة

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

من أنابيب اختبار بغطاء حلزونى (١٣ × ١٠٠مم) ، مع مرعاة عمل duplicate من كل محلول ، كما يؤخذ ١,٢ مل من جوهر رقم (١) كبلانك .

٣ - يضـاف ٠,٤ مل من جـوهر DTCS إلى جـميع الأنابيب ، وتقفل جيداً وتخلط محتوياتها ثم تحضن فى حمام مائى على ٣٧°م لمدة ٣ ساعات .

٤ - تنقل الأنابيب من الحمام المائى وتبرد لمدة ١٠ ق فى حمام ثلجى ، وببطء يضاف لكل أنبوبة ٢,٠ مل محلول حمض كبريتيك (١٢ M - جـوهر رقم ٣) مع استمرار الخلط والتقليب ، ثم تقفل الأنابيب وترج جيداً باستعمال vortex mixer (يجب الاتزيد درجة حرارة الأنابيب عن درجة حرارة الغرفة) .

٥ - يضبط جهاز الأسبكتروفوتومتر على صفر امتصاص (A) باستعمال البلانك على طول موجة ٥٢٠ nm ، وتسجل قراءات امتصاص العينة والـ standards . يتم توقيع نقط تركيز الـ standerds مع امتصاصها (A) على ورق رسم بيانى ويرسم المنحنى القياسى Standard curve

الحساب : -

يحسب تركيز حمض الأسكوربيك فى العينة من المنحنى القياسى ويضرب الرقم الناتج فى ٥ (تصحيح تخفيف البلازما بواسطة محلول حمض الميتا فوسفوريك) . وبهذا نحصل على تركيز حمض الأسكوربيك لكل ١٠٠ مل بلازما .

الطريقة الثانية (Wooton and King , 1969)

الأساس النظرى فى كلا الطريقتين واحد ولكن فى هذه الطريقة يتم ترسيب بروتينات البلازما بواسطة حمض ثلاثى كلورو حمض الخليك TCA ، كما تتم أكسدة حمض الأسكوربيك إلى حمض ديهيدو أسكوربيك عن طريقة الرج مع الفحم النباتى النشط .

الجواهر الكشافة : -

١ - محلول TCA (٧٠ جم / لتر) .

٢ - الفحم النباتى المنشط Activated charcol : - يغلى ٥٠ جم فحم نباتى مع ٢٥٠ مل حمض هيدروكلوريك(١ N تقريباً) ثم يرشح المزيج باستعمال قمع بوخنز ، ويغسل الفحم بالماء المقطر عدة مرات حتى يصبح محلول الغسيل

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الناتج(الراشح) لا يعطى نتيجة موجبه للكشف عن الكلوريد أو الحديد . وبعد الغسيل يجفف الفحم على ١٠٥°م فى فرن هوائى ويخزن فى زجاجة واسعة الفوهة .

٣ – محلول حمض كبرتيك (٥ M) : – يمزج ٢٧٠ مل حمض كبريتيك مركز (AR) مع ٥٠٠ مل ماء مقطر بارد ويكمل إلى لتر (مع مرعاة تحضيره كما سبق ذكره).

٤ – جوهر DNPH : – يذاب جرام واحد من الـ DNPH فى ١٠٠ مل من محلول حمض الكبريتيك (٥ M) ويحفظ فى الثلاجة.

٥ – محلول الثيويوريا : – يذاب ٢,٥ جم ثيويوريا فى مخلوط مكون من ٥٠ مل ايثانول و ٥٠ مل ماء مقطر (يحضر هذا المحلول طازجاً كل شهر).

٦ – محلول حمض الأسكوربيك القياسى : – يذاب ٥٠ ملجم حمض أسكوربيك فى ٥٠ مل ماء مقطر ، وتلك تعادل ١ ملجم / مل .

٧ – Working standard : – يؤخذ ٢,٠ مل من الجوهر رقم (٦) (الفيتامين القياسى) وتنقل إلى دورق معيارى سعة ٥٠ مل ويكمل الحجم النهائى بواسطة محلول TCA . وتركيزه يعادل ٠,٠٤ ملجم حمض أسكوربيك / مل .

التكنيك : –

١ – يؤخذ ١,٠مل من البلازما وتوضع فى أنبوبة طرد مركزى ، ثم يضاف إليها ٤ مل من محلول TCA ويمزج المحلول جيداً . وبعد ٥ ق يضاف ٠,١٥ جم فحم نباتى منشط ، ويرج المزيج جيداً مرة أخرى . وبعد ١٠ ق أخرى يتم فصل الفحم النباتى والبروتينات المترسبة بالطرد المركزى على ٢٥٠٠ rpm لمده ١٠ ق ، ويرشح السائل الرائق .

٢ – يؤخذ ٢,٠ مل من الراشح (تعادل ٠,٤ مل بلازما) فى أنبوبة معلمة عند حجم ٥,٠ مل ، ثم يضاف إليها ٠,١ جوهر ثيويوريا و ٠,٥ مل جوهر DNPH ، وتغطى الأنابيب جيداً و تحضن على ٣٧ °م لمدة ٣ ساعات . تنقل الأنابيب إلى حمام ثلجى ثم يضاف إليها ١,٠ مل حمض كبريتك مركز (AR) نقطة نقطة فى

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

زمن قدرة دقيقة واحده مع استمرار الخلط والتقليب أثناء اضافة الحمض بقضيب زجاجى ، ثم يترك لمدة ٣٠ ق حتى يتكون اللون خلالها وتكمل بعد ذلك إلى حجم ٥ مل بالماء ، ويمزج المخلوط جيداً.

٣ - يؤخذ ١,٠ مل من محلول الـ working standard فى أنبوبة خاصة وتعامل نفس معاملة العينة بالضبط (الخطوتين ١و٢) .

٤ - يقاس امتصاص الضوء بجهاز قياس الألوان على طول موجة ٥٤٠ nm فى وجود البلانك .

٥ - يمكن عمل منحنى قياسى بتركيزات مختلفة من محلول حمض الأسكوربيك القياسى بنفس خطوات التقدير .

الحساب : -

فى حاله استخدام محلول حمض الأسكوربيك القياسى الذى يحتوى على ٠,٠٠٤ ملجم لكل مل يمكن تطبيق هذه المعادلة : -

$$\text{Plasma ascorbic acid (mg / 100 ml)} = \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Reading of standard}} \times 0.004 \times \frac{100}{0.4}$$

$$= \frac{\text{Reading of unknown}}{\text{Readng of standard}} \times 1$$

حيث أن: -

٠,٠٠٤ = تركيز المحلول القياسى .

٠,٤ = الحجم المقدر فيه الفيتامين .

١٠٠ = التركيز منسوب إلى ١٠٠ مل .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

تقدير حمض الأسكوربيك فى الفواكه والخضر بطريقة سبكتروفوتومترية (Bajaj and Kaur ,1981)

الجواهر الكشافة : - يجب أن تكون جميع الكيماويات نقيه جداً (AR) .

١ - محلول موليبدات أمونيوم Ammonium molybdate (٥٪ وزن / حجم) .

٢ - محلول حمض أكساليك (٠,٠٥ M) ويحتوى على EDTA (٠,٢ mM) حديث التحضير .

٣ - محلول حمض كبريتيك مخفف (٥٪ وزن / وزن) .

٤ - محلول حمض ميتافوسفوريك - حمض خليك : - يذاب مع الرج ١٥ جم من كريات pellets حمض ميتافوسفوريك أو عصًى sticks منه مسحوقة حديثاً فى ٤٠ مل حمض خليك ثلجى و ٢٠٠ مل ماء مقطر ثم تخفف إلى ٥٠٠ مل بالماء ويرشح (يمكن حفظه لمدة ثلاث أيام فى الثلاجة) .

٥ - محلول حمض أسكوربيك قياسى (٠,١ ٪ وزن / حجم) فى محلول حمض أكساليك - EDTA (جوهر رقم ٢) ، ويستعمل حديث التحضير .

التكنيك : -

أ - المنحنى القياسى : -

١ - يؤخذ حجوم مختلفة من المحلول القياسى مقدارها ٠,١ و ٠,٢ و ٠,٣ و ٠,٤ و ٠,٥ و ٠,٦ مل ، ويوضع كل منها فى دورق معيارى سعة ٢٥ مل .

٢ - يضاف إلى كل منها كمية كافية من جوهر رقم (٢) بحيث تعطى حجم نهائى مقداره ٥ مل .

٣ - يضاف لكل دورق ٠,٥ مل جوهر ميتافوسفوريك - حمض خليك و٠,١مل محلول حمض كبريتيك (٥ ٪) ، وأخيراً ٢,٠ مل من محلول موليبدات الأمونيوم .

٤ - يخفف المحلول كله للعلامة بالماء وبعد ١٥ق يقاس الامتصاص على طول موجة ٧٦٠ nm ضد البلانك المحضر بنفس المحاليل ولكن بدون حمض أسكوربيك .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

ب - تقدير محتوى حمض الأسكوربيك فى الفواكه والخضر : -

١ - توزن وزنة معلومةه بالضبط من العينة وتستخلص بواسطة ١٠٠ مل من محلول حمض الأكساليك - EDTA فى waring blender لمدة دقيقتين.

٢ - للفواكه التى تحتوى على أكثر من ٥٠ ملجم حمض أسكوربيك لكل ١٠٠ جم عينة، يوصى بوزن ٥ جم عينة ، أما التى تحتوى على تركيزات قليلة فيوصى بـ ١٠ جم عينة .

٣ - يرشح المستخلص خلال ورق ترشح مناسب ثم الطرد المركزى .

٤ - بالنسبة للفواكه أو الخضر التى تحتوى على عصير ، يرشح العصير خلال طبقة مزدوجة من الموسلين (شاش) muslin ، ثم خلال ورق ترشيح واتمان رقم (١) ، ثم ينقل ٥,٠ مل من الراشح إلى دورق معيارى سعه ٢٥ مل ، وتجرى نفس الخطوات السابقة لاظهار اللون كما فى الخطوة (أ) .

٥ - فى حاله الفواكه التى تحتوى على عصير رائق ، تؤخذ كميه مناسبة من العصير وتخلط مع ٥,٠ مل محلول حمض أكساليك -EDTA ، وتكمل نفس الخطوات لإظهار اللون ، وبعد ١٥ ق يرشح المحلول الأزرق مرة أخرى ثم يقاس اللون على طول موجة ٧٦٠ nm فى وجود البلانك .

٦ - يحسب التركيز من المنحنى القياسى .

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المحتوى الفيتامينى لبعض الأغذية الشائعة (Paul and Southgate, 1978)

مع مراعاة أن هذه القيم منسوبة لكل ١٠٠ جم وهى متوسط لعدة تقديرات ، كما أنها تختلف باختلاف الصنف ، والنوع والمعاملة .... إلخ

الفيتامين / الغذاء	أ	كاروتين	د	ب ١	ب ٢	حمض نيكوتينيك	جـ	هـ	ب ٦	ب ١٢	حمض فوليك		حمض بانتوثينيك	بيوتين
											حـر	كلى		
	µg	µg	µg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	µg	µg	mg	µg
الحبوب ومنتجات الحبوب														
شعير Barley (مقشور ، نيىء)	٠	٠	٠	٠,١٢	٠,٠٥	٢,٥	٠	٠,٢	٠,٢٢	٠	٩	٢٠	٠,٥	—
شعير مسلوق boiled	٠	٠	٠	آثار	آثار	٠,٩	٠	آثار	آثار	٠	آثار	٣	٠,٢	آثار
ردة قمح Bran wheat	٠	٠	٠	٠,٨٩	٠,٣٦	٢٩,٦	٠	١,٦	١,٣٨	٠	١٣٠	٢٦٠	٢,٤	١٤
دقيق ذرة Cornflour	٠	٠	٠	آثار	آثار	آثار	٠	٠	آثار	٠	آثار	آثار	آثار	آثار
دقيق Flour (استخلاص ١٠٠٪)	٠	٠	٠	٠,٤٦	٠,٠٨	٥,٦	٠	١,٠	٠,٥٠	٠	٢٥	٥٧	٠,٨	٧
دقيق إستخلاص ٨٥ ٪ بنى	٠	٠	٠	٠,٤٢	٠,٠٦	٤,٢	٠	آثار	٠,٣٠	٠	٢٣	٥١	٠,٤	٣
دقيق إستخلاص ٧٢ ٪ أبيض	٠	٠	٠	٠,٣١	٠,٠٣	٢,٠	٠	آثار	٠,١٥	٠	١٤	٣١	٠,٣	١
مكرونة Macaroni (نيئة)	٠	٠	٠	٠,١٤	٠,٠٦	٢,٠	٠	آثار	٠,٠٦	٠	٤	١١	٠,٣	١
مكرونه مسلوقة	٠	٠	٠	٠,٠١	٠,٠١	٠,٣	٠	آثار	٠,٠١	٠	آثار	٢	آثار	آثار
طحين شوفان Oatmed (نيىء)	٠	٠	٠	٠,٥٠	٠,١٠	١,٠	٠	٠,٨	٠,١٢	٠	١١	٦٠	١,٠	٢٠
أرز Rice (مبيض ، نيىء)	٠	٠	٠	٠,٠٨	٠,٠٣	١,٥	٠	٠,٣	٠,٣٠	٠	١٥	٢٩	٠,٦	٣
أرز مسلوق	٠	٠	٠	٠,٠١	٠,٠١	٠,٣	٠	٠,١	٠,٠٥	٠	٣	٦	٠,٢	١

(—) أى لم تقـدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الغـــذاء / الفـيتامين	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حـر µg	حمض فوليك كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
دقيق راى Ryeflour (١٠٠٪)	٠	٠	٠	٠,٤٠	٠,٢٢	١,٠	٠	٠,٨	٠,٣٥	٠	٣١	٧٨	١,٠	٦
سيمولينا Semolina (نيئة)	٠	٠	٠	٠,١٠	٠,٠٢	٠,٧	٠	آثار	٠,١٥	٠	٢٠	٢٥	٠,٣	١
دقيق صويا Soya flour (كامل الدهن)	٠	—	٠	٠,٧٥	٠,٣١	٢,٠	٠	—	٠,٥٧	٠	—	—	١,٨	—
دقيق صويا (قليل الدهن)	٠	—	٠	٠,٩٠	٠,٣٦	٢,٤	٠	—	٠,٦٨	٠	—	—	٢,١	—
سباجيتى Spaghetti (نيئة)	٠	٠	٠	٠,١٤	٠,٠٦	٢,٠	٠	—	٠,٠٦	٠	٤	١٣	٠,٣	١
سباجيتى مسلوقة	٠	٠	٠	٠,٠١	٠,٠١	٠,٣	٠	—	٠,٠١	٠	آثار	٢	آثار	آثار
سباجيتى معلبة مع صلصلة	٠	آثار	٠	٠,٠١	٠,٠١	٠,٣	آثار	—	٠,٠١	٠	آثار	٢	آثار	آثار
<u>الخـــبز Bread</u>														
خبز بدقيق استخلاص ١٠٠٪	٠	٠	٠	٠,٢٦	٠,٠٨	٣,٩	٠	٠,٢	٠,١٤	٠	٢٢	٣٩	٠,٦	٦
خبز بدقيق استخلاص ٨٥٪ بنى	٠	٠	٠	٠,٢٤	٠,٠٦	٢,٩	٠	آثار	٠,٠٨	٠	٢١	٣٦	٠,٣	٣
خبز بدقيق استخلاص ٧٢٪ أبيض	٠	٠	٠	٠,١٨	٠,٠٣	١,٤	٠	آثار	٠,٠٤	٠	٦	٢٧	٠,٣	١
خبز (ابيض محمر fried)	٠	٠	٠	—	—	—	٠	—	—	٠	—	—	—	—
خبز (توست toasted)	٠	٠	٠	٠,١٧	٠,٠٤	١,٨	٠	آثار	—	٠	—	—	٠,٤	٢
ارغفة خبز Rolls (بنية جافة)	٠	٠	٠	٠,٢٣	٠,١٢	٢,٦	٠	آثار	٠,١٥	٠	٢١	٣٦	٠,٣	٣
ارغفة خبز (بنية طرية soft)	٠	٠	٠	٠,٢٣	٠,١٥	٢,٧	٠	آثار	٠,١٤	٠	٢١	٣٦	٠,٣	٣
ارغفة خبز (بيضاء جافة)	٠	٠	٠	٠,٢٣	٠,٠٧	١,٥	٠	آثار	٠,٠٦	٠	٧	٢٧	٠,٣	١
ارغفة خبز (بيضاء طرية)	٠	٠	٠	٠,٢٥	٠,٠٨	١,٤	٠	آثار	٠,٠٦	٠	٧	٢٧	٠,٣	١

(ـــ) أى لم تقـدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حـر µg	حمض فوليك كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
ارغفة (قليلة النشا starch reduced	٠	٠	٠	—	—	—	٠	آثار	—	٠	—	—	—	—
البسكويتات Biscuits														
بالشيكولاته Chocolate (مغطى بالكامل)	٠	آثار	٠	٠,٠٣	٠,١٣	٠,٥	٠	١,٣	٠,٠٤	٠	—	—	—	—
(سندوتش sandwich	٠	٠	٠	٠,١٤	٠,١٣	١,١	٠	٣,٤	٠,٠٤	٠	—	—	—	—
(نصف حلو semi-sweet	٠	٠	٠	٠,١٣	٠,٠٨	١,٥	٠	١,٤	٠,٠٦	٠	٨	—	—	—
(قليل الحلاوة short-sweet	٠	٠	٠	٠,١٦	٠,٠٤	٠,٩	٠	١,٣	٠,٠٥	٠	٨	—	—	—
ويفر Wafers (محشوة filled	٠	٠	٠	٠,٠٩	٠,٠٨	٠,٥	٠	١,٩	٠,٠٣	٠	—	—	—	—
الكيك Cakes														
كيك فاكهة (غنية rich)	١٢٠	١٠	١,١٤	٠,٠٨	٠,٠٨	٠,٠٥	٠	—	٠,١٣	آثار	٤	٤	٠,٢	٤
(غنية ومثلجة)	٨٠	٧	٠,٧٧	٠,١٢	٠,١٣	٠,٥	آثار	٢,٤	٠,١٠	آثار	٥	١٠	٠,٢	٣
اللبن ومنتجات اللبن														
لبن بقرى طازج (فى الصيف)	٣٥	٢٢	٠,٣٠	٠,٠٤	٠,١٩	٠,٠٨	١,٥	٠,١٠	٠,٠٤	٠,٣	٤	٥	٠,٣٥	٢,٠
لبن بقرى طازج (فى الشتاء)	٣٦	١٣	٠,١٣	٠,٠٤	٠,١٩	٠,٠٨	١,٥	٠,٠٧	٠,٠٤	٠,٣	٤	٤	٠,٣٥	٢,٠
لبن بقرى مبستر sterilised	٣١	١٨	٠,٢٢	٠,٠٣	٠,١٩	٠,٠٨	٠,٨	٠,٠٩	٠,٠٣	٠,٢	٣	٤	٠,٣٥	٢,٠
طويل العمر long life (معامل بـUHT)	٣١	١٨	٠,٢٢	٠,٠٤	٠,١٩	٠,٠٨	١,٥	٠,٠٩	٠,٠٤	٠,٢	٤	٥	٠,٣٥	٢,٠
لبن فرز skimmed (طازج)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٤	٠,٢٠	٠,٠٨	١,٦	آثار	٠,٠٤	٠,٣	٤	٥	٠,٣٦	٢,٠
لبن مكثف condensed ومُحلى sweetened	٩٩	٤٩	٠,٨٨	٠,٠٨	٠,٤٨	٠,٢٢	٢,٠	٠,٤٢	٠,٠٢	٠,٥	٤	٨	٠,٨٥	٣,٠

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حر µg	حمض فوليك كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
لبن فرز مكثف ومُحلى	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,٥٨	٠,٢٦	٢,٤	آثار	٠,٠٢	٠,٥	٥	١٠	١,٠	٣,٦
لبن جاف dried	٢٩٠	١٧٠	٠,٢٤	٠,٣٣	١,١	٠,٦٠	١٠,٠	٠,٦١	٠,٢٣	٢,٠	٣٢	٤٠	٢,٧	١٠
لبن فرز جاف	آثار	آثار	٠	٠,٤٢	١,٦	١,٢	٦,٠	آثار	٠,٢٥	٣,٠	١٤	٢١	٣,٥	١٦
لبن ماعز Goats	٤٠	٠	٠,٦٠	٠,٠٤	٠,١٥	٠,١٩	١,٥	—	٠,٠٤	آثار	١	١	٠,٣٤	٢,٠
لبن الأنسان	٦٠	٠	٠,٢٥	٠,٠٢	٠,٠٣	٠,٢٢	٣,٧	٠,٣٤	٠,٠١	آثار	٣	٥	٠,٢٥	٠,٧
زبد مملح salted	٧٥٠	٤٧٠	٠,٧٦	آثار	آثار	آثار	آثار	٢,٠	آثار	آثار	آثار	آثار	آثار	آثار
كريمة صيف single,	٢٠٠	١٢٥	٠,١٦٥	٠,٠٣	٠,١٢	٠,٠٧	١,٢	٠,٥	٠,٠٣	٠,٠٢	٣	٤	٠,٣٠	١,٤
كريمة شتاء single,	١٤٥	٧٠	٠,٨١	٠,٠٣	٠,١٢	٠,٠٧	١,٢	٠,٤	٠,٠٣	٠,٠٢	٣	٤	٠,٣٠	١,٤
كريمة صيف double,	٤٥٠	٢٨٠	٠,٣٧٦	٠,٠٢	٠,٠٨	٠,٠٤	٠,٨	١,٢	٠,٠٢	٠,١	٢	٢	٠,١٩	٠,٨
كريمة شتاء double,	٣٣٠	١٦٠	٠,١٨٣	٠,٠٢	٠,٠٨	٠,٠٤	٠,٨	٠,٩	٠,٠٢	٠,١	٢	٢	٠,١٩	٠,٨
كريمة مبسترة ومعلبة	١٩٠	١١٠	٠,١٣٥	٠,٠١	٠,١٠	٠,٦٠	آثار	٠,٥	٠,٠١	آثار	آثار	آثار	٠,٢٨	١,٣
الجـبن Cheese														
جبن شيدر Chedder	٣١٠	٢٠٥	٠,٢٦١	٠,٠٤	٠,٥٠	٠,١٠	٠	٠,٨	٠,٠٨	١,٥	—	٢٠	٠,٣٠	١,٧
جبن كريمة Cream cheese	٣٨٥	٢٢٠	٠,٢٧٥	٠,٠٢	٠,١٤	٠,٠٨	٠	١,٠	١,٠	٠,٣	٤	٥	—	—
جبن مطبوخة precessed	٢٤٠	١٢٠	٠,١٤٥	٠,٠٢	٠,٢٩	٠,٠٧	٠	—	—	—	١	٢	—	–
جبن دانمركى Danish Blue	٢٧٠	١٧٠	٠,٢٨٨	٠,٠٣	٠,٦٠	٠,٩٠	٠	٠,٧	٠,١٥	١,٢	—	٥٠	٢,٠	١,٥

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الغـــــذاء / الفـيتامين	أ μg	كاروتين μg	د μg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حـر μg	حمض فوليك كلى μg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين μg
اليوغورت Yogurt (قليل الدهن)														
يوغورت طبيعى natural	٨	٥	آثار	٠,٠٥	٠,٢٦	٠,١٢	٠,٤	٠,٠٣	٠,٠٤	آثار	١	٢	—	—
يوغورت بنكهة flavoured	٨	٥	آثار	٠,٠٥	٠,٢٥	٠,١١	٠,٤	٠,٠٤	٠,٠٤	آثار	٤	٨	—	—
يوغورت بالفواكه fruit	٨	٨	آثار	٠,٠٥	٠,٢٣	٠,١١	١,٨	٠,٠٧	٠,٠٤	آثار	آثار	٣	—	—
يوغورت بالبندق hazelnut	٨	٥	آثار	٠,٠٦	٠,٢٧	٠,١٢	٠,٤	٠,٥٨	٠,٠٤	آثار	آثار	٥	—	—
البيـــض Eggs														
كل البيضة (نيئة) whole	١٤٠	آثار	١,٧٥	٠,٠٩	٠,٤٧	٠,٠٧	٠	١,٦	٠,١١	١,٧	٢٥	٢٥	١,٨	٢٥
البياض white نيىء	٠	٠	٠	٠	٠,٤٣	٠,٠٩	٠	٠	آثار	٠,١	١,٠	١	٠,٣	آثار
الصـفار yolk نيىء	٤٠٠	آثار	٥,٠	٠,٣٠	٠,٥٤	٠,٠٢	٠	٤,٦	٠,٣٠	٤,٩	٤٨	٥٢	٤,٦	٦٠
بيض جاف dried	٤٩٠	آثار	٦,٠	٠,٣٥	١,٢	٠,٢٠	٠	٥,٦	٠,٤٠	٧,٠	—	—	٦,٢	—
بيض مسلوق boiled	١٤٠	آثار	١,٧٥	٠,٠٨	٠,٤٥	٠,٠٧	٠	١,٦	٠,١٠	١,٧	٢٢	٢٢	١,٦	٢٥
بيض محمر fried	١٤٠	آثار	١,٧٥	٠,٠٧	٠,٤٢	٠,٠٧	٠	١,٦	٠,٠٩	١,٧	١٧	١٧	١,٤	٢٥
بيض برشيت pouched	١٤٠	آثار	١,٧٥	٠,٠٧	٠,٣٨	٠,٠٧	٠	١,٦	٠,٠٩	١,٧	١٦	١٦	١,٤	٢٥
بيض أومليت omelette	١٩٠	٤٠	١,٧٥	٠,٠٧	٠,٣٢	٠,٠٦	٠	١,٥	٠,٠٩	١,٦	١٥	١٥	١,٣	٢٢
الزيـــوت والدهـــون														
زيت كبد الحوت Cod liver oil	١٨٠٠٠	آثار	٢١٠	٠	٠	٠	٠	٢٠,٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

(—) أى لم تقـدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حـر µg	حمض فوليك كلي µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
مارجرين بكل أنواعه Margarine	٨٠٠-١٠٠٠	٠	٧,٩٤	آثار	آثار	آثار	٠	٨,٠	آثار	آثار	آثار	آثار	آثار	آثار
زيوت نباتية	٠	آثار	٠	آثار	آثار	آثار	٠	تختلف على حسب النوع	آثار	٠	آثار	آثار	آثار	آثار
اللحوم ومنتجات اللحوم														
لحم جاموسي Beef														
لحم أحمر lean (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,٢٤	٥,٢	٠	٠,١٥	٠,٣٢	٢	٤	١٠	٠,٧	آثار
دهن fat نيىء	—	—	—	—	—	—	٠	٠,٣٢	—	آثار	—	—	—	آثار
دهن مطهى	—	—	—	—	—	—		٠,٥٥	—	آثار	—	—	—	آثار
لحم صدر brisket أحمر + دهن (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٥	٠,١٦	٣,٧	٠	٠,١٩	٠,٢٥	١	٣	٨	٠,٥	آثار
لحم صدر brisket مسلوق	آثار	آثار	آثار	٠,٠٤	٠,٣٠	٤,٣	٠	٠,٣٥	٠,٢٥	٢	٤	١٣	٠,٧	آثار
لحم مفروم mince (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٦	٠,٣١	٤,٠	٠	٠,١٨	٠,٢٧	٢	٣	٩	٠,٧	آثار
لحـــم stewed	آثار	آثار	آثار	٠,٠٥	٠,٣٣	٤,٤	٠	٠,٣١	٠,٣٠	٢	٤	١٦	٠,٨	آثار
شرائح ارداف نيئة (احمر +دهن)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,٢٦	٤,٢	٠	٠,١٧	٠,٢٧	٢	٣	٩	٠,٦	آثار
شرائح ارادف محمرة	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,٣٥	٥,٥	٠	٠,٣٣	٠,٢٩	٢	٤	١٥	٠,٨	آثار
شرائح ارداف محمرة (احمر فقط)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٩	٠,٤٠	٦,٣	٠	٠,٢٩	٠,٣٣	٢	٥	١٧	٠,٩	آثار
Topside نيىء (أحمر +دهن)	—	آثار	آثار	٠,٠٥	٠,٢١	٤,٨	٠	٠,١٧	٠,٢٨	٢	٣	٩	٠,٦	آثار
Topside مشوى (أحمر+دهن)	—	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,٣١	٥,٧	٠	٠,٣٢	٠,٢٩	٢	٤	١٥	٠,٨	آثار

(—) أي لم تقـدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفــــذاء / الفــيتامين	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حـر µg	حمض فوليك: كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
Topside مشوى (أحمر فقط)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,٣٥	٦,٥	٠	٠,٢٩	٠,٣٣	٢	٥	١٧	٠,٩	آثار
لحم الضأن Lamb														
لحم أحمر lean (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,١٤	٠,٢٨	٦,٠	٠	٠,١٠	٠,٢٥	٢	آثار	٥	٠,٧	٢
دهن (نيىء)	—	—	—	—	—	—	٠	٠,٣٠	—	آثار	آثار	—	—	آثار
دهن (مطهى)	—	—	—	—	—	—	٠	٠,١٨	—	آثار	آثار	—	—	آثار
صدر breast أحمر + دهن (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,١٧	٣,٨	٠	٠,١٨	٠,١٥	١	آثار	٣	٠,٤	١
صدر breast أحمر + دهن (مشوى)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٦	٠,١٧	٣,٤	٠	٠,١٣	٠,١٣	١	آثار	٣	٠,٤	١
صدر breast أحمر فقط (مشوى)	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,٢٩	٥,٦	٠	٠,١٠	٠,٢٢	٢	آثار	٤	٠,٧	٢
كستلاته Cutlets أحمر +دهن (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٩	٠,١٦	٣,٩	٠	٠,١٨	٠,١٥	١	آثار	٣	٠,٤	١
كستلاته Cutlets أحمر +دهن (مشوى)	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,٢٠	٤,٨	٠	٠,١٣	٠,١٥	٢	آثار	٣	٠,٥	١
كستلاته احمر + دهن بالعظم (مشوى)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,١٣	٣,٢	٠	٠,٠٩	٠,١٠	١	آثار	٢	٠,٣	١
كستلاته احمر فقط بالعظم (مشوى)	آثار	آثار	آثار	٠,١٥	٠,٣٠	٧,٢	٠	٠,١٠	٠,٢٢	٢	آثار	٤	٠,٧	٢
رجل leg أحمر + دهن (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,١٤	٠,٢٥	٥,٧	٠	٠,١٤	٠,٢٠	٢	آثار	٤	٠,٦	١
رجل leg أحمر + دهن (مشوية)	آثار	آثار	آثار	٠,١٢	٠,٣١	٥,٤	٠	٠,١١	٠,١٨	٢	آثار	٣	٠,٦	١
رجل leg أحمر فقط (مشوية)	آثار	آثار	آثار	٠,١٤	٠,٣٨	٦,٦	٠	٠,١٠	٠,٢٢	٢	آثار	٤	٠,٧	٢
لحم رقبة Scrag أحمر + دهن (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,١٧	٣,٤	٠	٠,١٦	٠,١٨	٢	آثار	٤	٠,٥	١
لحم رقبة احمر + دهن(مسبك stewed)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٤	٠,١٨	٢,٧	٠	٠,١١	٠,١٩	٢	آثار	٤	٠,٦	١

(—) أى لم تقـدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حر µg	حمض فوليك: كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
لحم رقبة أحمر فقط (مسبك)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٥	٠,٢١	٣,٢	٠	٠,١٠	٠,٢٢	٢	آثار	٤	٠,٧	٢
لحم رقبة أحمر فقط بالعظم (مسبك)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٣	٠,١١	١,٦	٠	٠,٠٥	٠,١١	١	آثار	٢	٠,٤	١
لحم العجل Veal														
Cutlet محمر	آثار	آثار	آثار	—	—	—	٠	—	—	١	آثار	—	—	آثار
Fillet نيء	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,٢٥	٧,٠	٠	—	٠,٣٠	١	آثار	٥	٠,٦	آثار
لحم مشوى	آثار	آثار	آثار	٠,٠٦	٠,٢٧	٧,٠	٠	—	.٣٢	١	آثار	٤	٠,٥	آثار
الدواجن														
الدجاج ، لحم فقط (نيء)	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,١٦	٧,٨	٠	٠,١٠	٠,٤٢	آثار	١٠	١٢	١,٢	٢
الدجاج ، لحم وجلد (نيء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,١٤	٦,٠	٠	—	٠,٣٠	آثار	٧	٨	٠,٩	٢
الدجاج ، لحم فاتح light (نيء)	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,١٠	٩,٩	٠	٠,٠٨	٠,٥٣	آثار	٨	١٢	١,٢	٢
الدجاج ، لحم غامق dark (نيء)	آثار	آثار	آثار	٠,١١	٠,٢٢	٥,٤	٠	٠,١٣	٠,٣٠	١	١٢	١٢	١,٣	٣
الدجاج ، لحم فقط مسلوق	آثار	آثار	آثار	٠,٠٦	٠,١٩	٦,٧	٠	٠,٠٧	٠,٣٥	آثار	٥	٨	١,١	٤
الدجاج ، لحم فاتح مسلوق	آثار	آثار	آثار	٠,٠٥	٠,١٢	٨,٩	٠	—	٠,٣٣	آثار	٤	٤	١,٠	٣
الدجاج ، لحم غامق مسلوق	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,٢٨	٤,٣	٠	—	٠,٣٧	١	٧	١٣	١,١	٤
الدجاج ، لحم فقط مشوى	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,١٩	٨,٢	٠	٠,١١	٠,٢٦	آثار	٨	١٠	١,٢	٣
الدجاج ، لحم وجلد مشوى	آثار	آثار	آثار	—	—	—	٠	—	—	آثار	—	—	—	—
الدجاج ، لحم فاتح مشوى	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,١٤	١٠,٣	٠	٠,٠٨	٠,٣٥	آثار	٦	٧	١,١	٢

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حر µg	حمض فوليك: كلي µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
الدجاج ، لحم غامق مشوى	آثار	آثار	آثار	٠,٠٩	٠,٢٤	٦,١	٠	٠,١٥	٠,١٦	١	١٠	١٣	١,٣	٣
البط ، لحم فقط (نيىء)	—	—	—	٠,٣٦	٠,٤٥	٥,٣	٠	—	٠,٣٤	٣	٧	٢٥	١,٦	٦
البط ، لحم وجلد ودهن (نيىء)	—	—	—	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
البط ، لحم فقط مشوى	—	—	—	٠,٢٦	٠,٤٦	٥,١	٠	٠,٠٢	٠,٢٥	٣	٧	١٠	١,٥	٤
البط ، لحم وجلد ودهن مشوى	—	—	—	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
أوز Goose مشوى	—	—	—	—	—	—	٠	—	٠,٤٣	—	—	—	—	—
حمام Pigeon مشوى	—	—	—	—	—	٨,٩	٠	آثار	—	—	—	—	—	—
حمام مشوى بالعظام	—	—	—	—	—	٣,٩	٠	آثار	—	—	—	—	—	—
رومى ، Turkey ، لحم فقط (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٩	٠,١٦	٧,٩	٠	آثار	٠,٤٦	٢	١١	١٥	٠,٨	٢
رومى ، لحم وجلد (نيىء)	—	—	—	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
رومى ، لحم فاتح (نيئ)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	١١	٩,٩	٠	آثار	٠,٥٩	١	٧	٨	٠,٠٨	١
رومى ، لحم غامق (نيئ)	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,٢٣	٥,٢	٠	آثار	٠,٣٠	٣	١٧	٢٥	٠,٩	٢
رومى ، لحم فقط مشوى	-آثار	آثار	آثار	٠٧	٠,٢١	٨,٥	٠	آثار	٠,٣٢	٢	١٢	١٥	٠,٨	٢
رومى ، لحم وجلد مشوى	—	آثار	آثار	—	—	—	٠	—	—	—	—	—	—	—
رومى ، لحم فاتح مشوى	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,١٤	١٠,٠	٠	٠,٠٢	٠,٣١	١	٩	١٣	٠,٧	١
رومى ، لحم غامق مشوى	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,٢٩	٦,٧	٠	آثار	٠,٣٢	٣	١٦	١٧	٠,٩	٢
أرانب (نيئة)	—	—	—	٠,١٠	٠,١٩	٨,٤	٠	٠,١٣	٠,٥٠	١٠	٤	٥	٠,٨	١

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الغــذاء \ الفيتامين	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حــر µg	حمض فوليك: كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
أرانب مسبك stewed	—	—	—	٠,٠٤	٠,١٤	٤,٣	٠	—	٠,٥٠	١٢	٣	٤	٠,٨	١
أرانب مسبك بالعظم	—	—	—	٠,٢٢	—	—	٠	—	٠,٢٦	٦	٢	٢	٠,٤	آثار
الأعضــاء Organs														
مـخ Brain عجل وحمل (نيئ)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,٢٤	٣,٠	٢٣	١,٢	٠,١٠	٩	٢	٦	٢,٠	٢
مخ عجل مسلوق	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,١٩	٢,٢	١٧	٢,٣	٠,١٢	٧	١	٣	١,٤	٣
مخ حمل مسلوق	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,٢٤	٢,١	١٧	١,١	٠,٠٨	٨	١	٦	١,٤	٣
قـلب Heart حمل (نيئ)	آثار	آثار	—	٠,٤٨	٠,٩	٦,٩	٧	٠,٣٧	٠,٢٩	٨	آثار	٢	٢,٥	٤
قلب ضأن Sheep (مشوى)	آثار	آثار	—	٠,٤٥	١,٥	٩,١	١١	٠,٧٠	٠,٣٨	١٤	آثار	٤	٣,٨	٨
قلب ثور Ox (نيئ)	آثار	آثار	—	٠,٤٥	٠,٨	٦,٣	٧	٠,٤٥	٠,٢٣	١٣	٢	٤	٢,٤	٢
قلب ثور مسبك	آثار	آثار	—	٠,٢١	١,١	٤,٧	٦	٠,٧٢	٠,١١	١٥	١	٢	١,٦	٤
كـلى Kidney حمل (نيئ)	١٠٠	—	—	٠,٤٩	١,٨	٨,٣	٧	٠,٤٥	٠,٣٠	٥٥	٢٠	٣١	٤,٣	٣٧
كلى حمل (محمر)	١٦٠	—	—	٠,٥٦	٢,٣	٩,٦	٩	٠,٤١	٠,٣٠	٧٩	٣٩	٧٩	٥,١	٤٢
كلى ثور (نيئ)	١٥٠	—	—	٠,٣٧	٢,١	٦,١	١٠	٠,١٨	٠,٣٢	٣١	٥٦	٧٧	٣,١	٢٤
كلى ثور (مسبك)	٢٥٠	—	—	٠,٢٥	٢,١	٤,٨	١٠	٠,٤٢	٠,٣٠	٣١	٤٩	٧٥	٣,٠	٤٩
كـبد liver عجل (نيئ)	١٤٦٠٠	١٠٠	٠,٢٥	٠,٢١	٣,١	١٢,٤	١٨	٠,٢٤	٠,٥٤	١٠٠	١٩٠	٢٤٠	٨,٤	٣٩
كبد liver عجل (محمر)	١٧٤٠٠	١٠٠	٠,٢٥	٠,٢٧	٤,٢	١٥,٦	١٣	٠,٥٠	٠,٧٣	٨٧	٢٢٠	٣٢٠	٨,٨	٥٣
كبد دجاج (نيئ)	٩٣٠٠	٠	٠,٢١	٠,٣٦	٢,٧	١٠,٢	٢٣	٠,٢٥	٠,٤٠	٥٦	٢٩٠	٥٩٠	٦,١	٢١٠

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حر µg	حمض فوليك: كلي µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
كبد دجاج (محمر)	١١١٠٠	٠	—	٠,٣٧	١,٧	١٠,٥	١٣	٠,٣٤	٠,٤٥	٤٩	١٦٠	٥٠٠	٥,٥	١٧٠
كبد خروف (نيئ)	١٨١٠٠	٦٠	٠,٥٠	٠,٢٧	٣,٣	١٤,٢	١٠	٠,٤٦	٠,٤٢	٨٤	١٥٠	٢٢٠	٨,٢	٤١
كبد خروف (محمر)	٢٠٦٠٠	٦٠	٠,٥٠	٠,٢٦	٤,٤	١٥,٢	١٢	٠,٣٢	٠,٤٩	٨١	١٤٠	٢٤٠	٧,٦	٤١
كبد ثور (نيئ)	١٦٥٠٠	١٥٤٠	١,١٣	٠,٢٣	٣,١	١٣,٤	٢٣	٠,٤٢	٠,٨٣	١١٠	٢٢٠	٣٣٠	٨,١	٣٣
الأسماك ومنتجاتها														
الأسماك البيضاء														
حوت Cod فليت طازج (نيىء)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٨	٠,٠٧	١,٧	آثار	٠,٤٤	٠,٣٣	٢	٨	١٢	٠,٢٠	٣
حوت معبأ backed	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,٠٧	١,٧	آثار	٠,٥٩	٠,٣٨	٢	٧	١٢	٠,٢٠	٣
حوت محمر فى زبد	آثار	آثار	آثار	—	—	—	آثار	—	—	—	—	—	—	—
Haddock طازج (نيئ)	آثار	آثار	آثار	٠,٠٧	٠,١٠	٤,٠	آثار	—	٠,٢٠	١	—	١٣	٠,٢٠	٥
Haddock محمر	آثار	آثار	آثار	—	—	—	آثار	—	—	—	—	—	—	—
Haddock مدخن smoked	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,١١	١,٧	آثار	—	٠,٣٥	٣	٣	٥	٠,٢٠	٣
السمك الدهنى Fatty fish														
ثعبان السمك Eel (نيئ)	١٢٠٠	آثار	—	٠,٢٠	٠,٣٥	٣,٥	آثار	—	٠,٣	١	—	—	٠,١٥	—
رنجة Herring (نيئ)	٤٥	آثار	٢٢,٥	آثار	٠,١٨	٤,١	آثار	٠,٢١	٠,٤٥	٦	٣	٥	١,٠	١٠
رنجة Herring محمرة	٤٩	آثار	٢٥,٠	آثار	٠,١٨	٤,٠	آثار	٠,٣٠	٠,٥٧	١١	٣	١٠	٠,٨٨	١٠
ماكريل Mackerel (نيئ)	٤٥	آثار	١٧,٥	٠,٠٩	٠,٣٥	٨,٠	آثار	—	٠,٧٠	١٠	—	—	١,٠	٧

(—) أى لم تقـدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ μg	كاروتين μg	د μg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك		حمض بانتوثينيك mg	بيوتين μg
											حر μg	كلى μg		
ماكريل Mackerel (محمر)	٥٢	آثار	٢١,١	٠,٠٩	٠,٣٨	٨,٧	آثار	—	٠,٨٤	١٢	—	—	٠,٩٦	٨
بيلشارد Pilchads معلب فى صلصلة طماطم	آثار	آثار	٨	٠,٠٢	٠,٢٩	٧,٦	آثار	٠,٧٠	—	١٢	—	—	—	—
سلمون Salmon (نيئ)	آثار	آثار	آثار	٠,٢٠	٠,١٥	٧,٠	آثار	—	٠,٧٥	٥	٤	٢٦	٢,٠	٥
ساردين Sardines معلب في زيت	آثار	آثار	٧,٥	٠,٠٤	٠,٣٦	٨,٢	آثار	٠,٣٠	٠,٤٨	٢٨	٣	٨	٠,٥٠	٥
تونة Tuna معلبة فى زيت	—	آثار	٥,٨	٠,٠٤	٠,١١	١٢,٩	آثار	٦,٣	٠,٤٤	٥	٧	١٥	٠,٤٢	٣
كابوريا Crab مسلوقة	آثار	آثار	آثار	٠,١٠	٠,١٥	٢,٥	آثار	—	٠,٣٥	آثار	٣	٢٠	٠,٦٠	آثار
جمبرى Shrimps مسلوق	آثار	آثار	آثار	٠,٠٣	٠,٠٣	٣,٠	آثار	—	٠,١٠	١	—	—	٠,٣٠	١
الخضــــروات														
خرشوف Artichokes مسلوق	٠	٩٠	٠	٠,٠٧	٠,٠٣	٠,٩	٨	—	٠,٠٧	٠	—	٣٠	٠,٢١	٤,١
أسبراجس Asparagus مسلوق	٠	٥٠٠	٠	٠,١٠	٠,٠٨	٠,٨	٢٠	٢,٥	٠,٠٤	٠	٥	٣٠	٠,١٣	٠,٤
فول بلدى Broad bean مسلوق	٠	٢٥٠	٠	٠,١٠	٠,٠٤	٣,٠	١٥	آثار	—	٠	—	—	٣,٨	٢,١
فاصوليا حمراء red kidney bean(نيئ)	٠	آثار	٠	٠,٥٤	٠,١٨	٢,٠	آثار	—	٠,٤٤	٠	٢٤	١٣٠	٠,٥٠	—
كرنب Cabbage أبيض (نيئ)	٠	آثار	٠	٠,٠٦	٠,٠٥	٠,٣	٤٠	٠,٢	٠,١٦	٠	١٩	٢٦	٠,٢١	٠,١
كرنب شتوى (نيئ)	٠	٣٠٠	٠	٠,٠٦	٠,٠٥	٠,٣	٥٥	٠,٢	٠,١٦	٠	٦٠	٩٠	٠,٢١	٠,١
كرنب شتوى مسلوق	٠	٣٠٠	٠	٠,٠٣	٠,٠٣	٠,٢	٢٠	٠,٢	٠,١٠	٠	٢	٣٥	٠,١٥	آثار
جزر كبير old (نيئ)	٠	١٢٠٠٠	٠	٠,٠٦	٠,٠٥	٠,٦	٦	٠,٥	٠,١٥	٠	١٢	١٥	٠,٢٥	٠,٦
جزر كبير old (مسلوق)	٠	١٢٠٠٠	٠	٠,٠٥	٠,٠٤	٠,٤	٤	٠,٥	٠,٠٩	٠	١	٨	٠,١٨	٠,٤

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

مع تحيات د. سلام حسين عويد الهلالي

https://scholar.google.com/citations?user=t1aAacgAAAAJ&hl=en

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.facebook.com/groups//Biothesis

https://www.researchgate.net/profile//Salam_Ewaid

07807137614



الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حر µg	حمض فوليك: كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
جزر صغير (مسلوق)	.	٦٠٠٠	.	٠,٠٥	٠,٠٤	٠,٤	٤	٠,٥	٠,٠٩	.	١	٨	٠,١٨	٠,٤
قرنبيط (نيئ)	.	٣٠	.	٠,١٠	٠,١٠	٠,٦	٦٠	٠,٢	٠,٢٠	.	٣٠	٣٩	٠,٦٠	١,٥
قرنبيط (مسلوق)	.	٣٠	.	٠,٠٦	٠,٠٦	٠,٤	٢٠	٠,١	٠,١٢	.	٢	٤٩	٠,٤٢	١,٠
كرفس Celery (نيىء)	.	آثار	.	٠,٠٣	٠,٠٣	٠,٣	٧	٠,٢	٠,١٠	.	٦	١٢	٠,٤٠	٠,١
كرفس مسلوق	.	آثار	.	٠,٠٢	٠,٠٢	٠,٢	٥	٠,٢	٠,٠٦	.	١	٦	٠,٢٨	آثار
خيار Cucumber (نيئ)	.	آثار	.	٠,٠٤	٠,٠٤	٠,٢	٨	آثار	٠,٠٤	.	١٤	١٦	٠,٣٠	٠,٤
فجل Horseradish (نيئ)	.	.	.	٠,٠٥	٠,٠٣	٠,٥	١٢٠	—	٠,١٥	.	—	—	—	—
كرات Leeks (نيئ)	.	٤٠	.	٠,١٠	٠,٠٥	٠,٦	١٨	٠,٨	٠,٢٥	.	—	—	٠,١٢	١,٤
كرات Leeks (مسلوق)	.	٤٠	.	٠,٠٧	٠,٠٣	٠,٤	١٥	٠,٨	٠,١٥	.	٧	—	٠,١٠	١,٠
عدس Lentils (مسلوق)	.	٢٠	.	٠,١١	٠,٠٤	٠,٤	آثار	—	٠,١١	.	١	٥	٠,٣١	—
خس Lettuce (نيئ)	.	١٠٠٠	.	٠,٠٧	٠,٠٨	٠,٣	١٥	٠,٥	٠,٠٧	.	١٩	٣٤	٠,٢٠	٠,٧
الكوسة Marrow (نيئة)	.	٣٠	.	آثار	آثار	٠,٣	٥	آثار	٠,٠٦	.	١٣	١٣	٠,١٠	٠,٤
الكوسة مسلوقة	.	٣٠	.	آثار	آثار	٠,٢	٢	آثار	٠,٠٣	.	١	٦	٠,٠٧	—
مشروم Mushroom (نيئ)	.	.	.	٠,١٠	٠,٤٠	٤,٠	٣	آثار	٠,١٠	.	٢٠	٢٣	٢,٠	—
مشروم Mushroom محمر	.	.	.	٠,٠٧	٠,٣٥	٣,٥	١	آثار	٠,٠٦	.	١٧	٢٠	١,٤	—
بامية Okra (نيئة)	.	٩٠	.	٠,١٠	٠,١٠	١,٠	٢٥	—	٠,٠٨	.	٢٥	١٠٠	٠,٢٦	—
بصل Onions (نيئ)	.	.	.	٠,٠٣	٠,٠٥	٠,٢	١٠	آثار	٠,١٠	.	١٥	١٦	٠,١٤	٠,٩

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الغـــذاء / الفـيتامين	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حـر µg	حمض فوليك: كلي µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
بصل Onions مسلوق	.	.	.	٠,٠٢	٠,٠٤	٠,١	٦	آثار	٠,٠٦	.	آثار	٨	٠,١٠	٠,٦
بصل Onions محمر	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
بقدونس Parsley (نيئ)	.	٧٠٠٠	.	٠,١٥	٠,٣٠	١,٠	١٥٠	١,٤	٠,٢٠	.	—	—	٠,٣٠	٠,٤
بازلاء Peas طازجة (نيئة)	.	٣٠٠	.	٠,٣٢	٠,١٥	٢,٥	٢٥	آثار	٠,١٦	.	—	—	٠,٧٥	٠,٥
بازلاء طازجة مسلوقة	.	٣٠٠	.	٠,٢٥	٠,١١	١,٥	١٥	آثار	٠,١٠	.	—	—	٠,٣٢	٠,٤
بازلاء جافة (نيئة)	.	٢٥٠	.	٠,٦٠	٠,٣٠	٣,٠	آثار	آثار	٠,١٣	.	٢١	٣٣	٢,٠	—
بازلاء جافة مسلوقة	.	٨٠	.	٠,١١	٠,٠٧	١,٠	آثار	آثار	—	.	آثار	—	—	—
فلفل أخضر Peppers (نيئ)	.	٢٠٠	.	آثار	٠,٠٣	٠,٧	١٠٠	٠,٨	٠,١٧	.	٥	١١	٠,٢٣	—
فلفل أخضر مسلوق	.	٢٠٠	.	٠,٠١	٠,٠٢	٠,٦	٦٠	٠,٨	٠,١٤	.	١	١١	٠,١٦	—
بطاطس كبيرة (نيئة)	.	آثار	.	٠,١١	٠,٠٤	١,٢	٢٠–٨	٠,١	٠,٢٥	.	١٠	١٤	٠,٣٠	٠,١
بطاطس كبيرة مسلوقة	.	آثار	.	٠,٠٨	٠,٠٣	٠,٨	١٤–٤	٠,١	٠,١٨	.	٣	١٠	٠,٢٠	آثار
بطاطس كبيرة رقائق Chips	.	آثار	.	٠,١٠	٠,٠٤	١,٢	١٦–٥	٠,١	٠,١٨	.	٣	١٠	٠,٢٠	آثار
سبانخ Spinach مسلوق	.	٦٠٠٠	.	٠,٠٧	٠,١٥	٠,٤	٢٥	٢,٠	٩,١٨	.	٣٠	١٤٠	٠,٢١	٠,١
ذرة سكرية على القوالح (نيئة)	.	٢٤٠	.	٠,١٥	٠,٠٨	١,٨	١٢	٠,٨	٠,١٩	.	٤٣	٥٢	٠,٥٤	—
ذرة سكرية على القوالح مسلوقة	.	٢٤٠	.	٠,٢٠	٠,٠٨	١,٧	٩	٠,٥	٠,١٦	.	١٨	٣٣	٠,٣٨	—
بطاطا Sweet potatoes (نيئة)	.	٤٠٠٠	.	٠,١٠	٠,٠٦	٠,٨	٢٥	٠,٤	٠,٢٢	.	٣٥	٥٢	٠,٩٤	—
بطاطامسلوقة	.	٤٠٠٠	.	٠,٠٨	٠,٠٤	٠,٦	١٥	٠,٤	٠,١٣	.	٤	٢٥	٠,٦٦	—

(—) أي لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حر µg	حمض فوليك كلي µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
طماطم Tomatoes (نيئة)	٠	٦٠٠	٠	٠,٠٦	٠,٠٤	٠,٧	٢٠	١,٢	٠,١١	٠	١٥	٢٨	٠,٣٣	١,٥
طماطم Tomatoes معلبة	٠	٥٠٠	٠	٠,٠٦	٠,٠٣	٠,٧	١٨	١,٢	٠,١١	٠	١١	٢٥	٠,٢٠	١,٥
لفت Turnips (نيئ)	٠	٠	٠	٠,٠٤	٠,٠٥	٠,٦	٢٥	٠	٠,١١	٠	١٧	٢٠	٠,٢٠	٠,١
الفواكـــــه														
تفاح Apples الجزء المأكول	٠	٣٠	٠	٠,٠٤	٠,٠٢	٠,١	٣	٠,٢	٠,٠٣	٠	٢	٥	٠,١٠	٠,٣
تفاح بالقشر والقلب	٠	٢٣	٠	٠,٠٣	٠,٠٢	٠,١	٢	٠,٢	٠,٠٢	٠	٢	٤	٠,٠٨	٠,٢
مشمش Apricots طازج (نيىء)	٠	١٥٠٠	٠	٠,٠٤	٠,٠٥	٠,٦	٧	—	٠,٠٧	٠	٤	٥	٠,٣٠	—
مشمش Apricots طازج جاف	٠	٣٦٠٠	٠	آثار	٠,٢٠	٣,٠	آثار	—	٠,١٧	٠	١٠	١٤	٠,٧٠	—
افوكادو Avocado pears	٠	١٠٠	٠	٠,١٠	٠,١٠	١,٠	١٥	٣,٢	٠,٤٢	٠	٥٥	٦٦	١,٠٧	٣,٢
مـــــوز (نيئ)	٠	٢٠٠	٠	٠,٠٤	٠,٠٧	٠,٦	١٠	٠,٢	٠,٥١	٠	١٤	٢٢	٠,٢٦	—
كريز Cherries الجزء المأكول	٠	١٢٠	٠	٠,٠٥	٠,٠٧	٠,٣	٥	٠,١	٠,٠٥	٠	٦	٨	٠,٢٦	٠,٤
بلح جاف Dates	٠	٥٠	٠	٠,٠٧	٠,٠٤	٢,٠	٠	—	٠,١٥	٠	١٤	٢١	٠,٨٠	—
تين Figs green (نيـئ)	٠	٥٠٠	٠	٠,٠٦	٠,٠٥	٠,٤	٢	—	٠,١١	٠	—	—	٠,٣٠	—
تين Figs green جـاف	٠	٥٠	٠	٠,١٠	٠,٠٨	١,٧	٠	—	٠,١٨	٠	٣	٩	٠,٤٤	—
سلاطة فواكه Fruit salad معلبة	٠	٣٠٠	٠	٠,٠٢	٠,٠١	٠,٣	٣	—	٠,٠١	٠	١	٤	٠,٠٤	٠,١
عنب اسود Grapes, black (نيئ)	٠	آثار	٠	٠,٠٤	٠,٠٢	٠,٣	٤	—	٠,١٠	٠	٣	٦	٠,٠٥	٠,٣
عنب أبيض (نيئ)	٠	آثار	٠	٠,٠٤	٠,٠٢	٠,٣	٤	—	٠,١٠	٠	٣	٦	٠,٠٥	٠,٣

(—) أى لم تقـدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الفيتامين / الغذاء	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حر µg	حمض فوليك كلي µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
جريب فروت Grapefruit (نيئ)	·	آثار	·	٠,٠٥	٠,٠٢	٠,٢	٤٠	٠,٣	٠,٠٣	·	٩	١٢	٠,٢٨	١,٠
جريب فروت معلب	·	آثار	·	٠,٠٤	٠,٠١	٠,٢	٣٠	آثار	٠,٠٢	·	٣	٤	٠,١٢	١,٠
برقوق أخضر green gages (نيئ)	·	—	·	٠,٠٥	٠,٠٣	٠,٤	٣	٠,٧	٠,٠٥	·	١	٣	٠,٢٠	آثار
جوافة معلبة Gauavas	·	١٠٠	·	٠,٠٤	٠,٠٣	٠,٩	١٨٠	—	—	·	—	—	—	—
ليمون Lemons كل الثمرة	·	آثار	·	٠,٠٥	٠,٠٤	٠,٢	٨٠	—	٠,١١	·	—	—	٠,٢٣	٠,٥
ليمون ، عصير طازج	·	آثار	·	٠,٠٢	٠,٠١	٠,١	٥٠	—	٠,٠٥	·	٧	٧	٠,١٠	٠,٣
اليوسفي Mandarin oranges معلب	·	٥٠	·	٠,٠٧	٠,٠٢	٠,٢	١٤	آثار	٠,٠٣	·	٥	٨	٠,١٥	٠,٨
مانجو Mangoes (نيئة)	·	١٢٠٠	·	٠,٠٣	٠,٠٤	٠,٣	٣٠	—	—	·	—	—	٠,١٦	—
مانجو Mangoes معلبة	·	١٢٠٠	·	٠,٠٢	٠,٠٣	٠,٢	١٠	—	—	·	—	—	—	—
الكانتالوب Canteloupe (نيئ)	·	٢٠٠٠	·	٠,٠٥	٠,٠٣	٠,٥	٢٥	—	٠,٠٧	·	٣٠	٣٠	٠,٢٣	—
شمام Yellowmelons (نيئ)	·	١٠٠	·	٠,٠٥	٠,٠٣	٠,٥	٢٥	٠,١	٠,٠٧	·	٣٠	٣٠	٠,٢٣	—
بطيخ Watermelon (نيئ)	·	٢٠	·	٠,٠٢	٠,٠٢	٠,٢	٥	٠,١	٠,٠٧	·	٢	٣	١,٥٥	—
توت Mulberries	·	آثار	·	٠,٠٥	٠,٠٤	٠,٤	١٠	—	٠,٠٢	·	٥	٥	٠,١٥	—
زيتون مملح Olives in brine	·	١٨٠	·	آثار	آثار	آثار	·	—	٠,٠٢	·	—	—	٠,٠٢	آثار
برتقال نيئ	·	٥٠	·	٠,١٠	٠,٠٣	٠,٢	٥٠	٠,٢	٠,٠٦	·	٣٠	٣٧	٠,٢٥	١,٠
برتقال ، كل الثمرة نيئ	·	٣٨	·	٠,٠٨	٠,٠٢	٠,٢	٣٨	٠,٢	٠,٠٥	·	٢٣	٢٨	٠,١٨	٠,٨
برتقال ، عصير طازج	·	٥٠	·	٠,٠٨	٠,٠٢	٠,٢	٥٠	آثار	٠,٠٤	·	٣٠	٣٧	٠,١٩	٠,٨

(—) أي لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الغـــــذاء / الفـيتامين	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك حـر µg	حمض فوليك كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
خوخ طازج Peaches	٠	٥٠٠	٠	٠,٠٢	٠,٠٥	١,٠	٨	—	٠,٠٢	٠	٢	٣	٠,١٥	٠,٢
خوخ جاف Peaches	٠	٢٠٠٠	٠	آثار	٠,١٩	٥,٣	آثار	—	٠,١٠	٠	١٠	١٤	٠,٣٠	—
خوخ معلب Peaches	٠	٢٥٠	٠	٠,٠١	٠,٠٢	٠,٦	٤	—	٠,٠٢	٠	٢	٣	٠,٠٥	٠,٢
كمثرى الجزء المأكول Pears	٠	١٠	٠	٠,٠٣	٠,٠٣	٠,٢	٣	آثار	٠,٠٢	٠	٤	١١	٠,٠٧	٠,١
كمثرى كل الثمرة	٠	٧	٠	٠,٠٢	٠,٠٢	٠,١	٢	آثار	٠,٠١	٠	٣	٨	٠,٠٥	٠,١
أناناس طازج Pineapple	٠	٦٠	٠	٠,٠٨	٠,٠٢	٠,٢	٢٥	—	٠,٠٩	٠	٩	١١	٠,١٦	آثار
أناناس معلب Pineapple	٠	٤٠	٠	٠,٠٥	٠,٠٢	٠,٢	١٢	—	٠,٠٧	٠	٢	—	٠,١٠	آثار
الرمان عصير Pomegranate	٠	—	٠	٠,٠٢	٠,٠٣	٠,٢	٨	—	—	٠	—	—	—	—
سفرجل (نيئ) Quince	٠	آثار	٠	٠,٠٢	٠,٠٢	٠,٢	١٥	—	—	٠	—	—	—	—
زبيب جاف Raisins	٠	٣٠	٠	٠,١٠	٠,٠٨	٠,٥	٠	—	٠,٣٠	٠	٤	٤	٠,١٠	—
الرواند Rhubarb	٠	٦٠	٠	٠,٠١	٠,٠٣	٠,٣	١٠	٠,٢	٠,٠٣	٠	٨	٨	٠,٠٨	—
فراولة (نيئة) Strawberries	٠	٣٠	٠	٠,٠٢	٠,٠٣	٠,٤	٦٠	٠,٢	٠,٠٦	٠	١٥	٢٠	٠,٣٤	١,١
فراولة معلبة Strawberries	٠	آثار	٠	٠,٠١	٠,٠٢	٠,٣	٢١	—	٠,٠٣	٠	٨	٢٠	٠,٢١	٠,١
الكشميش جافة Sultanas	٠	٣٠	٠	٠,١٠	٠,٠٨	٠,٥	٠	٠,٧	٠,٣٠	٠	٤	٤	٠,١٠	—
Tangerine نوع من اليوسفى (نيئ)	٠	١٠٠	٠	٠,٠٧	٠,٠٢	٠,٢	٣٠	—	٠,٠٧	٠	٩	٢١	٠,٢٠	—
النقـــــل Nuts														
جوز هند طازج Coconut	٠	٠	٠	٠,٠٣	٠,٠٢	٠,٣	٢	٠,٠٧	٠,٠٤	٠	٩	٢٦	٠,٢٠	—

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

الغـــذاء / الفـيتامين	أ µg	كاروتين µg	د µg	ب ١ mg	ب ٢ mg	حمض نيكوتينيك mg	جـ mg	هـ mg	ب ٦ mg	ب ١٢ mg	حمض فوليك: حـر µg	حمض فوليك: كلى µg	حمض بانتوثينيك mg	بيوتين µg
جوز هند Coconut لبن	٠	٠	٠	آثار	آثار	٠,١	٢	آثار	٠,٠٣	٠	—	—	٠,٠٥	—
فول سودانى Peanut طازج	٠	٠	٠	٠,٩٠	٠,١٠	١٦	آثار	٨,١	٠,٥٠	٠	٢٨	١١٠	٢,٧	—
فول سودانى محمص ومملح	٠	٠	٠	٠,٢٣	٠,١٠	١٦	آثار	٨,١	٠,٤٠	٠	—	—	٢,١	—
زبدة الفول السودانى	٠	٠	٠	٠,١٧	٠,١٠	١٥	آثار	٤,٧	٠,٥٠	٠	١٦	٥٣	٢,١	—
اللوز Almonds	٠	٠	٠	٠,٢٤	٠,٩٢	٢,٠	آثار	٢٠,٠	٠,١٠	٠	٣٣	٩٦	٠,٤٧	٠,٤

(—) أى لم تقدر

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

المراجــــــــع

1 - A.O.A.C. (1975), Official Methods of Analysis of the Associatian of Official Analytical Chemists, 12th ed., Washington, DC. (US A).

2 - A.O.A.C. (1990), Official Methods of Analysis of the Associatian of Official Analytical Chemists, 15th ed., Arlington, Virginia (US A).

3 - Bajaj, K.L. and Kaur, G. (1981), Analyst 106, 117

4 - Baker, H. and Frank, O. (1968), Clinical Vitaminalogy, p. 172. New York : Wiley.

5 - Beadle, M. and Zscheile, A. (1942), J.Bioli. Chem .144,21.

6 - Bradley, D.W. and Hornbeck, C.L. (1973). Biochem. Med, 7 : 78.

7 - Campbell, J.A. (1961), Methodology of protein evaluation. RAG Nutr. Document R. 101 add. 37, June meeting, New York.

8- De Leemheer, A.P. and De Ruyter, M.G.M. (1975) (eds)., Modern Chromatographic Analysis of The Vitamins; vol.30 of Chramatographic Science Series, Marcel Dekker, INC, New York and Basel.

9 - Dickes, G.J. (1966), J. of the Association of Pubblic Analysts, 4, 50

10 - Emmerie, A. and Engel, C. (1939), Recueil des travaux chiniqnes des Pays - Pas et de la Belgique, 58, 283.

11 - Fetuga, B.L. ; Babatunde, G.M. and Oyenuga, V.A (1973), J. Sci. Fd. Agric., 24, 1515

12 - Friedrich, W. (1988), Vitamins, de Gruyter (eds), Berlin, New York.

13 - Gibson, S.L.M., Moore, F.M.L. and Goldberg, A. (1966), Brit. Med. J., 1 : 1152.

14 - Gloster, J.A. and Harris, P. (1962), Clin. Chim. Acta; 7 ; 206.

15 - Groenendijk, G.W.T. ; Jansen, P.A.A. ; Bonting, S.L. and Daemeu, F.J.M. (1980), Meth. Enzymol., 67f, 203.

16 - Gyory, P. and Rubin, S.H. (1950), "Chemical methods of vitamin assay" in "Vitamin Methods", Gyorgy, P. (eds), Academic press Inc.,

salamalhelali@yahoo.com مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

publishers , New York, PP 147 .

17 - Harkness, J.E. and Wagner, J.E. (1989), The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents . 3rd ed . Lea and Febiger (eds) , Philadelphia , London .

18 - Harris , L. J. and Ray, S. N. (1935), Lancet; 1: 71, 462

19 - Hawk, P.B.; Oser, B.L. and Summerson, W.H.(1954), Practical Physiological Chemistry , 13th ed., McGrawhill Book Co., INC., New York , Toranto and London .

20 - Hegsted , D.M. ; Mills , R.C.; Elvehjem, G.A. and Hart, E.B. (1941) Choline in the nutriton of chicks . J. Biol. Chem. ; 138 , 459 .

21 - Huff, J.W. and Perlzweig , W.A. (1947), J. Biol. Chem . ; 167 , 157.

22 - Kutsky, R.J. (1973) , Handbook of Vitamins and Hormones, Van Nostrand Reinhold Co ., New York, Toranto , London and Melbourne .

23 - Lin , H.J. and Kirsch , J.F. (1977) , Anal. Biochem., 81, 442 .

24 - Marks, J. (1975), Aguide to the vitamins , Medical and technical publishing Co. Ltd . England .

25 - Meyskens, F.L.; Moon, T.E. ; Alberts, D.S. and Ritenbaugh, C. (1984), N. Engl. J. Med., 311, 121

26 - Neeld , J.B. and Pearson, W.N. (1963) , J.Nutr., 79 , 454

27 - Nino, H.V. and Shaw, W. (1982), "Vitamins" in "Fundamentals of Clinical Chemistry", 2nd ed. (W.B. Saunders Company , eds) USA, PP. 542

28 - Paul, A. A. and Southgate, D. A. T. (1978), The composition of foods, 4 th ed., HER MAJESTY'S STATIONERY OFFICE, London, England.

29 - Pearson, D. (1976), The Chemical Analysis of Foods, 7th ed., Churchill Livingstone , London and New York .

30 - Price, J.M.; Brown, R.R. and Yess, N. (1965), In Advances in Metabalic Disorders , Vol.2. (Levine, R. and Luft, R., eds) PP. 159 .

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

New York , London : Academic press .

31 - Satoh, K. and Price, J.M. (1958) . J.Biol. Chem ., 230 : 781 .

32 - Sauberlich , H. E. et al. (1972), Amer. J. Clin. Nutr .; 25 : 756

33 - Schanderl, S.H. (1970), "Vitamin Assay" , in "Methods in food anlysis" . 2nd ed., Joslyn , M.A. (eds) . Academic press , New York, London, pp 754

34 - Slater, E.C. and Morell, D.B. (1946), Biochem . J., 40 : 644, 652.

35 - Stroev, E.A. and Makarova (1989) Laboratory Manual in Biochemistry , Mis publishers - Moscow .

36 - Varley , H.; Gowenlock , A.H. and Bell, M. (1976) , 5th ed., Vol. 2, William Heinemann Medical Books Ltd., London , pp.215 .

37 - Varley , H. (1988), In "Practical Clinical Biochem" 6th ed. (Gowenlock, A.H.; McMurray , J.R. and Mclauchlan, D.M., eds) PP.894. Heinemann Medical Books , London .

38 - Wooton, L.O.P. and King , E.J. (1959) Micro - analysis in Medical Biochemistry , 3rd ed., London , Toronto .

39 - The United States of Pharmacopeia . Official form January 1, 1985 , 21 revision , 16th ed., U.S. pharmacopeial convetion , Inc., Twinbrook parkway .

تم بحمد الله

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com

رقم الإيداع

٩٩/٧٨١٧

مطابع الدار الهندسية

ISBN: 977-281-099-9

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي salamalhelali@yahoo.com